

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOCINEY DOS SANTOS LIMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RNAdf DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ENDOFÍTICOS DA PLANTA MEDICINAL
Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira)**

CURITIBA
2008

JOCINEY DOS SANTOS LIMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RNA^{df} DE ISOLADOS DE
Colletotrichum spp. ENDOFÍTICOS DA PLANTA MEDICINAL
Schinus terebinthifolius Raddi (Aroeira)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Chirlei Glienke
Co-orientador: Prof. Dra. Vanessa Kava

CURITIBA
2008

Aos meus pais,
Francisca das Chagas Lima e José Palmeira
de Lima (*in memoriam*), grandes espíritos
que me acompanham nessa existência, por
todo o esforço que tiveram em se empenhar
e permitir que eu tivesse sempre uma boa
educação, conduta e caráter, e o apoio
incondicional na luta pelos meus objetivos,
sempre contando com o apoio deles me
dando amor, carinho, compreensão, que
muito ajudaram para a conclusão desta
tarefa.

Agradecimentos

A Deus pela minha vida e pelas oportunidades oferecidas, obrigado sempre pela saúde, proteção e a certeza que estas comigo.

A minha mãe Francisca das Chagas, minha grande mentora, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

A minha família, meus irmãos Josely e Josiete, meus cunhados Elane e Robson, meus sobrinhos Jennifer, Jefferson e Johatan; pelo amor, dedicação, paciência e carinho que me dispensam enquanto estive fora buscando meus objetivos.

A minha orientadora Professora Doutora Chirlei Glienke, pela oportunidade e confiança para realizar meu objetivo.

A Doutoranda Josiane Figueiredo pela ajuda preciosa e sua dedicação em me auxiliar nos trabalhos de laboratório.

A coordenação do curso de Pós Graduação em Genética Maria Luiza Petzl Erler e Ricardo Lehrtonen, e seu colegiado.

Aos professores do curso de Pós Graduação, que com os seus conhecimentos me orientaram e aconselharam, permitindo a conclusão deste mestrado. Aos professores doutores Enilze, Ricardo, Erasto, Iglenir, Eleidi, Karam, Nina, Margarete, Ives, João Carlos, Roseli, Vanessa, Lygia, Valéria, Marina, Vânia Vicente e Vanete Soccol (Microbiologia), Lucélia (Biologia celular), Berenice (Bioquímica) e Sônia Pileggi (UEPG) dos quais obtive o apoio e as informações necessárias para o meu aprimoramento e que me permitem ser um profissional mais qualificado;

Aos meus incríveis colegas de turma Liana Oliveira, Gustavo Propst, Fernanda Ribas, Fabiana, Wanessa Ramsdorf, Benn Alle, especialmente Kelly Nunes, Marcos Maciel, Márcio Moraes, Liziane Brusamarello, com os quais pude conviver e trocar experiências, debater idéias e, acima de tudo, criar novas amizades.

A todos os funcionários e técnicos do departamento de genética, Valéria Romeiro, Luciana Marques, Anilda Gomes, D. Izolde o meu obrigado.

A Universidade Federal do Paraná (UFPR), ao Departamento de Genética e o programa de Pós Graduação em Genética por ter me permitido o uso de suas instalações, onde realizei meu mestrado;

Aos amigos sempre presentes e mesmo os meus amigos distantes que me apoiaram e incentivaram para continuar na luta, em especial Joselia, Diego Osvando, Carlos Fábio e Etiene.

Aos companheiros de jornada, Guaracira pelos conselhos e apoio em todos os momentos, aos colegas e estagiários de laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR; aos colegas do mestrado Renata Rodrigues e Tatiane Mariuse por compartilharem momentos bons e ruins nesses dias de mestrado, Rafael Noletto pela ajuda com as fotos, Carol Bernardi, Delyana, Patrícia, Fábio, Thais, Clineu, Vitor, Márcia, Rafaelito, João Fowler, Roger, Fausto, Alessandro, Manoela, Cristiane, Lupe, Clarissa, Márcia Pincerati, Roxane, Maria Cristina Cortinhas, André, Daniele, Carol, Douglas e tantos outros que compartilharam aulas e momentos descontraídos.

Aos membros da banca de defesa professoras doutoras Vânia Aparecida Vicente, Lygia V. Galli Terasawa, Patrícia Dalzoto pelas correções e orientações apresentadas para a melhoria desta dissertação, meu muito obrigado pela ajuda e compreensão nesses momentos difíceis.

Ao concluir este trabalho, não poderia deixar de externar os agradecimentos a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização desse objetivo.

“Quando nada parece ajudar, eu vou e olho o cortador de pedras martelando sua rocha talvez cem vezes sem que nem uma so rachadura apareça. No entanto, na centésima primeira martelada, a pedra se abre em duas e eu sei que não foi aquela a que conseguiu, mas todas as que vieram antes.”

Jacob Riis

RESUMO

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), uma *Anacardiaceae*, arbórea comum na América do Sul e conhecida como aroeira-vermelha, possuem importância comercial por se tratar de uma planta com propriedades medicinais, fitoquímicas e alimentícias, pelo consumo de seus frutos a pimenta rosa. Foi relatada a existência de variação na produção de princípios ativos entre plantas localizadas no Campus Politécnico da UFPR (com produção) e a plantas localizadas em Guaraqueçaba (BOROS, 2007). O gênero *Colletotrichum* é frequentemente isolado como endófito sendo um dos gêneros dominantes, além disso, também inclui alguns dos principais fungos fitopatogênicos principal agente das antracnoses e causa prejuízos econômicos em plantações por todo o mundo. Espécies deste gênero são de difícil identificação. Pileggi *et al.* (2008) sugeriram a rápida separação das espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. boninense* por meio de características morfológicas. Foram isolados microrganismos endofíticos das plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi com variação na produção de fitoquímicos. Verificou-se que as plantas analisadas são colonizadas por uma grande variabilidade de microrganismos endofíticos, sendo que os principais gêneros isolados nas plantas com produção de princípio ativo foram *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Phomopsis* e *Pestalotiopsis*. Nas plantas sem produção de princípio ativo, os principais gêneros endofíticos isolados foram *Phyllosticta* e *Colletotrichum*. As plantas analisadas foram colonizadas principalmente pela espécie *C. gloeosporioides*, sendo encontrada por meio de marcadores RAPD, grande diversidade genética nestes isolados. Utilizando-se os marcadores morfológicos, foi possível sugerir três grupos de *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides* L1, *C. gloeosporioides* L2 e *Colletotrichum* sp. Assim, verificou-se que características morfológicas são importantes na identificação das espécies de *Colletotrichum*, porém são insuficientes. Por meio de PCR espécie específico, confirmou-se a identificação das espécies de *C. gloeosporioides* e foi identificado um isolado como pertencente à espécie *C. boninense*. Partículas de RNAdf foram encontradas em 3 linhagens de *C. gloeosporioides* sem no entanto haver associação com características morfológicas ou perfil de RAPD.

Palavras chaves - *Colletotrichum* spp, Aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi), Endofíticos, RAPD.

ABSTRACT

The Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi), an Anacardiaceae, common tree in South America and known as Brazilian pepper, have commercial importance because it is a plant with medicinal and phytochemicals properties, in the food because of the consumption of its fruits pink pepper. It was reported that there is variation in the production of active principles from plants located in Campus Politécnico UFPR (with production) and plants located in Guaraqueçaba (BOROS, 2007). The genus *Colletotrichum* is frequently isolated as endophytes being one of the dominant genera, in addition, also includes some of the major pathogenic fungi key agent of anthracnose and cause economic losses in crops around the world. Species of this genus are difficult to identify. Pileggi *et al.* (2007) suggested the rapid separation of the species of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* by morphological characteristics. Endophytic microorganisms were isolated from plants of *Schinus terebinthifolius* Raddi with variation in the production of phytochemicals. It was found that the plants analyzed are colonized by a great variety of endophytic microorganisms, and the main genera isolated in plants with production of active principle were *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Phomopsis* and *Pestalotiopsis*. In plants without producing the active principle, the main genera were isolated endophytic *Colletotrichum* and *Phyllosticta*. The plants studied were colonized mainly by species *C. gloeosporioides*, was found by RAPD markers, genetic diversity in these isolates. Using the morphological markers, it was possible to suggest three groups of *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides* L1, *C. gloeosporioides* L2 and *Colletotrichum* sp. Thus, it was found that morphological characteristics are important in identifying the species of *Colletotrichum*, but are insufficient. Through species-specific PCR, confirmed the species identification of *C. gloeosporioides* and one isolate was identified as belonging to the species *C. boninense*. RNAdf particles were found in three strains of *C. gloeosporioides* but without an association with morphological or RAPD profile.

Keywords - *Colletotrichum* spp, brazilian pepper tree (*S. terebinthifolius* Raddi), endophytic, RAPD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Isolamento de fungos endofíticos de fragmentos foliares de aroeira após 04 dias de incubação a 25 °C em meio BDA.....	41
FIGURA 2: Aspecto macroscópico das colônias de <i>Colletotrichum</i> sp, endofíticos de folhas de aroeira.....	45
FIGURA 3: Macro-morfologia das colônias dos isolados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp. Em meio BDA após 14 dias de crescimento a 22°C.....	46
FIGURA 4: Média de crescimento micelial de 46 isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. após 6 dias de crescimento em meio BDA (MERCK) a 22°C.....	48
FIGURA 5: Fotomicrografia dos isolados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio BDA após 7 dias de crescimento a 22°C.....	49
FIGURA 6: Perfil de amplificação dos isolados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	52
FIGURA 7: Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre os isolados de endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp. por meio de marcadores moleculares RAPD.....	55
FIGURA 8: Análise de componentes principais (bidimensional) de similaridade genética dos isolados endofíticos <i>Colletotrichum</i> spp. utilizando os marcadores RAPD.....	56
FIGURA 9: Análise de componentes principais (tridimensional) de similaridade genética dos isolados endofíticos <i>Colletotrichum</i> spp. utilizando os marcadores RAPD.....	57
FIGURA 10: Eletroforese em gel de agarose com as reações de PCR dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp utilizando o <i>primer</i> CGint específico para <i>C. gloesporioides</i>	62
FIGURA 11: Eletroforese em gel de agarose com as reações de PCR dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. utilizando o <i>primer</i> COL1 específico para <i>Colletotrichum</i> sp.....	63
FIGURA 12: Eletroforese em gel de agarose dos ácidos nucléicos totais de 21 isolados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	66
FIGURA 13: Eletroforese em gel de agarose dos ácidos nucléicos totais de 4 isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. após tratamentos com RNase, nuclease S1 e DNase.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Uma amostra representativa das espécies do gênero <i>Colletotrichum</i> sp os seus associados teleomórficos <i>Glomerella</i> sp, e uma indicação do hospedeiro (adaptado de Skipp <i>et al.</i> , 1995).....	12
TABELA 2: Componentes da reação de amplificação de DNA de <i>Colletotrichum</i> spp. e respectivas concentrações utilizadas em uma reação de RAPD.....	37
TABELA 3: Número de microrganismos endofíticos obtidos de fragmentos foliares de aroeira em meio BDA, AC e NA no isolamento 01 campus Centro Politécnico UFPR.....	42
TABELA 4: Número de microrganismos endofíticos obtidos de fragmentos foliares de aroeira em meio BDA, AC e NA no isolamento 02 Guaraqueçaba/PR.....	42
TABELA 5: Comprimento e largura dos conídios de 28 isolados de <i>Colletotrichum</i> spp após 6 dias de crescimento em meio BDA a 22 °C.....	50
TABELA 6: Resultados gerais das caracterizações morfológicas e moleculares dos isolados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/mL: micrograma por mililitro

µL : microlitro

cm : centímetro

DNA: ácido desoxirribonucleico

g : grama

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetro

°C : graus Celsius

PCR : Polymerase Chain Reaction

U : unidade

V:volume

q.s.p.:quantidade suficiente para

N: normal

v/v:volume por volume

1X:diluições de 1 vez

PB:pares de base

µM:micro molar

ng:nanograma

dNTP: dinucleotídeos trifosfatados

V/cm: volume por centímetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Microrganismos endofíticos.....	6
3.1.1. Considerações gerais.....	6
3.1.2. Isolamento de endófitos	7
3.1.3. Ocorrência de endófitos	8
3.1.4. Endófitos isolados de plantas medicinais.....	9
3.2 Aroeira (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi)	9
3.2.1. Aspectos botânicos, ecológicos e distribuição geográfica.....	9
3.2.2. Componentes químicos e propriedades terapêuticas	10
3.3 O gênero <i>Colletotrichum</i>	11
3.3.1. Caracterização Morfológica.....	11
3.4. Marcadores moleculares do tipo RAPD.....	13
3.5. RAPD em espécies do gênero <i>Colletotrichum</i>	15
3.6. RNA Dupla fita em fungos.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Material vegetal	23
4.2. Meios de cultura	23
4.3. Soluções e tampões.....	28
4.4 Métodos.....	32
4.4.1 Isolamento dos microrganismos endofíticos.....	32
4.4.2 Conservação dos isolados endofíticos	33
4.4.3 Identificação dos microrganismos endofíticos	33
4.4.5 Obtenção de colônias monospóricas	33
4.4.6 Caracterização morfológica molecular de <i>Colletotrichum</i> spp.....	34
4.4.7 Caracterização Molecular de <i>Colletotrichum</i> spp.	35
4.4.7.1 Extração de DNA.....	35
4.4.7.2 Análise da variabilidade genética por RAPD	36
4.4.8. PCR.....	37
4.4.9 RNA Dupla Fita	38
4.4.9.1 Tratamento com RNase	38
4.4.9.2 Tratamento com Nuclease S1	38
4.4.9.3 Tratamento com DNase	39
5.1. Isolamento de microrganismos endofíticos de Aroeira.....	41
5.2 Caracterização morfológica de <i>Colletotrichum</i> spp.	43
5.3. Caracterização molecular de <i>Colletotrichum</i> spp.	50
5.4. Identificação por PCR espécie específica	60
5.5 RNA Dupla Fita	63
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1.INTRODUÇÃO

A partir do início dos anos 80 o interesse em encontrar agentes antimicrobianos naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico tem aumentado consideravelmente, neste contexto, muitos microrganismos endofíticos foram isolados e analisados, embora descritos na literatura desde 1866.

Microrganismos endofíticos são aqueles que colonizam tecidos internos das plantas sem causar qualquer efeito negativo imediato (BACON e WHITE, 2000) podendo conferir certos benefícios à planta. Existe uma grande diversidade endofítica constituída principalmente por bactérias e fungos que não causam prejuízos aos hospedeiros. Há alguns anos não se sabia da grande potencialidade dos endofíticos, entretanto tal interesse vem aumentando com a descoberta recente de recursos na área farmacêutica e biotecnológica, envolvendo esses microrganismos (STROBEL e DAYSE, 2003; WANG *et al.* 2000; STROBEL *et al.*, 2000; ZOU *et al.*,2000; LU *et al.*,2000; STROBEL *et al.*, 1999; CASTILLO *et al.*, 2002, SHRESTHA *et al.*, 2001; STROBEL, 2002; STROBEL, *et al.*, 2003; STROBEL, *et al.*, 1997; STROBEL, *et al.*1999; STROBEL, *et al.*, 1996; LEE, *et al.*, 1996; LI, *et al.*, 2001 e LI e STROBEL, 2001; AZEVEDO *et al.*,2000; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; SCHULTZ *et al.*, 2002; DAYSE *et al.*,2002; PIMENTEL *et al.*,2001a; PIMENTEL *et al.*, 2001b; SOUZA,1996; SOUZA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2004; AZEVEDO,1998; GLIENKE 1995; MAIATAN 1998; ARAÚJO 1996; ARAÚJO, *et al.*, 2000; RUBINI *et al.*, 2005; ALMEIDA, YARA e ALMEIDA 2005; STAMFORD *et al.*, 2001; STAMFORD *et al.*, 2002; SUTO *et al.*, 2002)

Diversos microrganismos endofíticos, como os fungos, as bactérias e actinomicetos, são encontrados nos espaços intercelulares de tecidos de diversos vegetais, entre eles a aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi), planta pertencente à família *Anacardiaceae* (CRONQUIST, 1981), nativa do Brasil. Essa planta medicinal, localizada principalmente no sul do Brasil, possui inúmeras potencialidades medicinais e fitoquímicas (óleos, resinas), com alguns de seus metabólicos secundários auxiliando no tratamento e cura de diversas doenças, com ação bactericida, antiviral e em alguns tipos de câncer (GUERRA *et al.*, 2000; AMORIM e SANTOS, 2003).

As cascas e folhas secas da aroeira são utilizadas contra febres, problemas do trato urinário, contra cistites, uretrites, diarreias, blenorragia, tosse e bronquite, problemas menstruais com excesso de sangramento, gripes e inflamações. Em geral, sua resina é indicada para o tratamento de reumatismo e ínguas, além de servir como purgativo e combater doenças respiratórias. Empregam-se também contra a blenorragia, bronquites, orquites crônicas e doenças das vias urinárias. Seu óleo resina é usado externamente como cicatrizante e para dor-de-dente. Na medicina popular as cascas e as folhas são utilizadas externamente como anti-sépticas em fraturas e feridas expostas. (LORENZI e MATTOS, 2002; GUERRA *et al.*, 2000)

O óleo essencial é o principal responsável por várias atividades desta planta, especialmente à ação antimicrobiana contra vários tipos de bactérias e fungos e contra vírus de plantas, bem como atividade repelente contra a mosca doméstica. É rico em monoterpenos e é indicado em distúrbios respiratórios. É eficaz em micoses, candidíases e alguns tipos de câncer (carcinoma, sarcoma, etc.) e como antiviral e bactericida (KAISHA e KIER, 1962; CAMPELO e MARSAIOLI, 1975).

Embora a literatura apresente referências sobre o estudo de endofíticos isolados de plantas medicinais, pouco se sabe sobre a comunidade endofítica existente na Aroeira. É sabido que a planta apresenta alto potencial farmacológico e o potencial antimicrobiano, sendo interessante um estudo mais aprofundado sobre os aspectos da biologia dos microrganismos que vivem em seu interior, bem como a relação entre estes e a aroeira, para que desta maneira se possa compreender melhor o seu papel na produção de fármacos.

Os microrganismos mais abundantes habitando de forma endofítica plantas em todo o mundo, pertencem ao gênero *Colletotrichum*. Entretanto, espécies deste gênero são de difícil identificação. Vários autores tem descrito novas espécies e associado características morfológicas para a identificação de espécies de *Colletotrichum* (FREEMAN *et al.*, 1998; AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003; PILEGGI *et al.*, 2008). Pileggi *et al.* (2008) relataram ser possível a separação das espécies *C. gloeosporioides* e *C. boninense* por meio da medida do crescimento radial do micélio em condições apropriadas. Assim, os isolados pertencentes à espécie *C. gloeosporioides* crescem mais rapidamente do que isolados de *C. boninense* quando cultivados a 22°C em meio BDA por 6 dias. Afanador-Kafuri *et al.* (2003) desenvolverem pares de *primers* específicos para as espécies *C. gloeosporioides*,

C. acutatum e isolados de espécie não conhecida denominados de *Colletotrichum* sp. Pileggi *et al.* (2008) relataram que os isolados descritos Freeman *et al.* (1998) como pertencentes a uma nova espécie, que denominada *C. boninense*, eram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados por Afanador-Kafuri *et al.* (2003). Entretanto, Pileggi utilizou apenas 15 isolados e *Colletotrichum* spp e seus achados devem ser confirmados.

Muitos fungos filamentosos, entre eles *Botritis cinerea* (HOWITT *et al.* 1995), *Aspergillus* spp. (VARGA *et al.*, 1994) e *Rhizopus* (PAPP *et al.* 2001) apresentam partículas de RNAdf em seu citoplasma. Muitos autores têm investigado a influência que tais partículas virais exercem sobre os fungos. Dalzoto *et al* (2006) registraram aumento na produção de conídios quando as linhagens foram curadas da partícula de RNAdf.

Mudanças morfológicas das colônias associadas com a presença RNAdf foram descritas em *Chalara elegans* (PUNJA, 1994), *Metarhizium anisopliae* (MELZER e BIDOCHKA 1998; GIMENEZ-PECCI *et al.*, 2002) e *Nectria radiculicola* (PYUNG & HWAN, 2001). Entretanto, são poucos os trabalhos que descrevem a presença de RNAdf em fungos endofíticos (ZABALGOGEAZCOA *et al.*, 1998), geralmente não sendo detectadas diferenças na morfologia das colônias entre isolados com ou livres RNAdf.

Em *Colletotrichum* há apenas um registro da presença de RNAdf associado a partículas virais, que foi descrito por Rawlinson *et al* em 1975. em *C. lindemuthianum*. Entretanto, não foi investigada a ação que tais partículas possam exercer na morfologia ou fisiologia de fungos deste gênero. Sendo este, um dos principais fungos fitopatogênicos e endofíticos descritos no Brasil, torna-se fundamental a investigação destas partículas.

Sendo assim, objetivou-se neste trabalho a confirmação dos achados de Pileggi *et al.* (2008), além da investigação da comunidade endofítica existente em diferentes plantas de aroeira. Tais plantas apresentam diferenças quanto à composição fitoquímica e potencial medicinal (VICENTE, 2007, comunicação pessoal).

2. OBJETIVOS

1. Investigar a presença de microrganismos endofíticos do interior de tecidos (folhas) aparentemente sadios de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira).
2. Comparar a comunidade endofítica de plantas de aroeira de diferentes procedências e propriedades fitoterápicas.
3. Identificar o principal grupo de microrganismo.
4. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp por meio de marcadores moleculares RAPD e marcadores morfológicos.
5. Avaliar a existência de partículas de RNA dupla fita nos isolados de *Colletotrichum* spp.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Microrganismos endofíticos

3.1.1. Considerações gerais

Os microrganismos endofíticos são aqueles que colonizam tecidos internos das plantas sem causar qualquer efeito negativo imediato (BACON e WHITE, 2000). O termo endofítico foi utilizado inicialmente em 1866 por Barry (citado por AZEVEDO, 1998) para designar a microbiota interna dos tecidos vegetais em caso de infecções assintomáticas ou não e nos casos de interação antagonísticas ou simbióticas.

Em 1991, Petrini propôs uma definição para endófitos: “todos os organismos que em algum período do seu ciclo de vida, colonizam tecidos internos da planta, sem causar dano aparente ao seu hospedeiro”. Sendo considerados endófitos que apresentam uma fase epifítica longa bem como patógenos latentes que podem viver assintomaticamente em seus hospedeiros por um tempo em seu ciclo de vida. Assim, Sinclair em 1991 considerando que a patogenicidade esta relacionada a fase sexual do fungo propôs o termo anamorfo, para o fungo mutualista e teleomorfo para o fungo patogênico, tentando assim reduzir a dificuldade em se distinguir endófitos verdadeiros e o uso indiscriminado do termo endofítico criado após a definição de Petrini em 1991.

Os microrganismos penetram nos tecidos vegetais de seus hospedeiros através dos estômatos, raízes, ferimentos e cicatrizes, ou ainda através de secreção de enzimas hidrolíticas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). A infecção ocorre por meio de fissuras e a colonização ocorre nos espaços intercelulares das camadas de células epidermais, podendo haver penetração nas células, dificilmente observada em condições naturais (STROBEL, 2003). Embora as interações entre vegetais e endofíticos, ainda não sejam bem esclarecidos, verificou-se que os endófitos apresentam uma relação que podem ser mutualística, antagonística ou neutra com o hospedeiro (WHITE e COLE, 1986).

Os microrganismos apresentam propriedades de interesse no campo para o controle biológico, promovendo a proteção contra predadores e patógenos, além de poderem contribuir para o aumento da resistência a condições de estresse, alterações nas propriedades fisiológicas, produção de fito-hormônio e toxinas. Para

a indústria farmacêutica, na produção de antibióticos, imunossuppressores, anti tumorais (STROBEL *et al.*, 1993; STROBEL *et al.*, 1996; SHRESTA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2000) e na produção de compostos de interesse biotecnológico, como enzimas (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2000; STAMFORD *et al.*, 2001; STAMFORD *et al.*, 2002; SUTO *et al.*, 2002; STROBEL, 2003).

Os microrganismos endofíticos encontrados nos vegetais são fungos e bactérias, sendo os fungos mais frequentes. Muitos destes fungos endofíticos produzem metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos (LI *et al.*, 2001; LI e STROBEL, 2001; ZOU e TAN, 2001), anti-helmínticos e inseticidas (AZEVEDO *et al.*, 2000; ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004) além de apresentar grande potencial que pode ser explorado na agricultura (ZOU e TAN, 2001).

3.1.2. Isolamento de endófitos

A melhor maneira de estudar os endófitos é isolar e cultivar tais microrganismos em laboratório, com cuidados especiais para excluir os microrganismos epifíticos, que vivem na superfície das folhas, pecíolo e sementes. A desinfecção é um processo fundamental para o adequado isolamento de endófitos, devendo-se levar em consideração o tempo e a concentração de agentes desinfetantes de acordo com cada material utilizado, razão para se adequar uma metodologia de isolamento ideal, para que somente microrganismos epifíticos sejam eliminados (BLANCO, 1999).

Após a escolha da metodologia de desinfecção são utilizados meios de culturas adequados ao grupo que se queira isolar, utilizando também antibióticos ou fungicidas específicos, processo que determinará o crescimento específico de um determinado microrganismo. Outro fator relevante para o isolamento é a idade da planta e dos órgãos utilizados, local e época de coleta, temperatura de incubação das placas e a recorrência do isolado (PETRINI, 1991; AZEVEDO, 1998).

Os microrganismos endofíticos podem ser visualizados no interior de tecidos vegetais por meio de microscopia ótica (WHITE Jr.; MORGAN-JONES; MORROW, 1993) ou eletrônica (VIRET; PETRINI, 1994), ou ainda identificados por métodos sorológicos (SINCLAIR, 1991).

3.1.3. Ocorrência de endófitos

Existe uma diversidade enorme de microrganismos endofíticos presentes no interior de plantas saudáveis com grande potencial para serem estudados.

A ocorrência de endófitos e a frequência de infestação variam de acordo com a espécie hospedeira, origem geográfica da mesma e o clima da região onde foi isolado. A composição de espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação. Uma ou duas espécies são predominantes como endofíticas em um dado hospedeiro enquanto outros isolados são poucos frequentes (CARROLL e CARROL, 1978; ARNOLD *et al*, 2003).

Os grupos mais frequentes de microrganismos endofíticos estudados e descritos em trabalhos na última década, são os fungos, predominante no maior número de trabalhos descritos na literatura, seguidos de bactérias e actinomicetos (PETRINI, 1991; FISHER; PETRINI; LAPPIN SCOTT, 1992; CHANWAY, 1996; HALLMANN *et al*, 1997; RODRIGUES; PETRINI, 1997; AZEVEDO, 1998; OKANE; NAKAGIRI; ITO, 1998; AZEVEDO *et al*, 2000; STROBEL, 2002; STROBEL, 2003).

Com maior frequência e aparecendo em grande número de plantas estão os fungos do gênero *Colletotrichum*, diversas espécies desse fungo são consideradas patógenos latentes porque induzem lesões em tecidos vegetais senescentes, sendo possível que os patógenos latentes estejam em estágios transitórios entre patógenos virulentos e os endófitos ou saprófitos.

Em folhas de porta-enxertos de *Citrus* os isolados endofíticos mais abundantes foram de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia citricarpa* e *Cladosporium* sp. (ARAÚJO *et al*. 2001). Fungos endofíticos de folhas, pseudocauls e rizomas de gengibre (*Amomum siamense* Criab.), coletados na Tailândia, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella* spp, *Xylaria* spp e *Phomopsis* spp foram os endófitos dominantes (BUSSABAN *et al*., 2001). Isolados de folhas, flores e frutos de macieiras (*Malus domestica*) no sul do Brasil, os fungos endofíticos mais frequentes foram *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Botryosphaeria*, entre os fungos filamentosos (CAMATTI-SARTORI *et al*., 2005).

Em banana, gengibre, soja, manga foram isolados *Colletotrichum* spp que foram identificados e agrupados de acordo com a morfologia da colônia, tamanho e

formato de apressórios e conídios, bem como análise molecular baseada em seqüências ITS de rDNA (PHOTITA *et al.*, 2005).

3.1.4. Endófitos isolados de plantas medicinais

Em 1995, Stierle *et al.* identificaram taxol no fungo *Taxomyces andreanae*, no interior da planta medicinal *Taxus brevifolia*, utilizada para o tratamento de câncer. Lu *et al.* (2000) caracterizaram a substância artemisinina, produzida pelo fungo *Colletotrichum* sp., endófito isolado da planta medicinal *Artemisia annua* L. produtora de droga antimalárica muito utilizada na China. Zou *et al.* (2000) isolaram da planta *Artemisia annua* o endofítico *C. gloeosporioides*, produtor da substância antimicrobiana chamada ácido coletótrico.

Um lipopeptídeo antimicótico, a criptocadina, que é produzido pelo fungo *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* isolado da planta medicinal *Tripterigeum wilfordii*, apresentou excelente ação antifúngica contra *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, além de possuir atividade contra fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*. (STROBEL *et al.* 1999).

Shresta *et al.* (2001) constataram a produção de paclitaxeles derivados, utilizada no tratamento de câncer, pelos fungos endofíticos *Sporormia minima* e *Trichothecium* sp., isolados da planta medicinal *Taxus wallichiana*, e pelo fungo *Taxus andreanae* isolados da planta medicinal *Taxus brevifolia* (STROBEL *et al.*, 1993; 1996). O fungo *Tuberculosis* sp, isolado da planta medicinal *Taxus marei* também demonstrou atividade anticancerígena (WANG *et al.*, 2000).

3.2 Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

3.2.1. Aspectos botânicos, ecológicos e distribuição geográfica

S. terebinthifolius Raddi, a popular aroeira vermelha, é uma espécie pioneira e dióica, pertencente à família *Anacardiaceae* (CRONQUIST, 1981; FLEIG, 1987). Uma espécie arbórea comum na América do Sul e conhecida como pimenta-rosa ou aroeira-vermelha (CARMELLO-GUERREIRO e PAOLI, 1999). É uma importante fonte de goma-resina da família *Anacardiaceae*. Seu exsudato tem propriedades

febrífugas, homeostática e antitussígena (OLIVEIRA e GROTTA, 1965). Seus frutos são numerosos, pequenos, de coloração vermelho-brilhante e portadores de uma secreção pegajosa que exerce um efeito paralisante sobre pássaros, quando ingeridos, provavelmente devido ao efeito tóxico da secreção (KAISTHA e KIER, 1962).

A pequena semente do fruto da aroeira vermelha é utilizada essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária universal. No entanto, a aroeira é especialmente apropriada para a confecção de molhos que acompanham as carnes brancas, de aves e peixes, por não abafar o seu gosto sutil (LORENZI e MATTOS, 2002).

A aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi), planta nativa da Região Sul do Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai, Chile, Peru e Bolívia. Está distribuída por todo o litoral paranaense. Floresce de novembro até março, às vezes irregularmente e frutifica em seguida. Os frutos podem permanecer até a próxima floração (RIBAS *et al.*, 2006).

3.2.2. Componentes químicos e propriedades terapêuticas

S. terebinthifolius Raddi possui importância comercial por se tratar de uma planta com propriedades medicinais, fotoquímicas (GUERRA *et al.*, 2000; AMORIM e SANTOS, 2003) e alimentícios, pelo consumo de seus frutos a pimenta rosa, utilizados na cozinha nacional e internacional como um tipo de condimento alimentar (LORENZI e MATOS, 2002).

Apresenta potencial anti-séptico, antiinflamatória, balsâmica, hemostático. Tem sido usado como um tônico e para o tratamento de ferimentos e infecções urinárias e respiratória, anti-diarréica, antileucorréica, adstringente, diurética, emenagogo, purgativa, estomáquica, vulnerária, fungicida e bactericida. Seus efeitos são descritos na medicina popular em regiões distintas do Brasil (LORENZI e MATOS, 2002).

Jorge e Markmann (1996) descreveram as principais características morfo-histológicas e químicas da espécie *S. terebinthifolius* Raddi, com vistas ao seu reconhecimento laboratorial como droga. A composição fenólica das cascas é diferente da composição fenólica das folhas. O estudo químico e microscópico da *S. terebinthifolius* Raddi, demonstrou que tanto as folhas como as cascas são igualmente ricas em taninos e em óleo essencial, mas diferindo substancialmente no

que se refere à presença de saponinas. Entretanto a ação cicatrizante da droga reside nos taninos. A reação de Shinoda, positiva para as cascas, sugere a presença de flavonóides, o que indica uma potencialização da ação cicatrizante das cascas de *S. terebinthifolius* Raddi, pois os flavonóides são geralmente antiinflamatórios. Os autores relataram que as cascas apresentam reações positivas para saponinas e flavonóides, merecendo maiores estudos químico-estruturais e farmacológicos, pois podem prestar-se como alternativa eficaz aos antiinflamatórios de síntese química que provocam irritação gástrica (JORGE e MARKMANN, 1996).

Em um estudo para verificar o modo de ação e os efeitos terapêuticos da aroeira, no combate ao processo inflamatório e no processo de reparo do tecido sobre as lesões ulceradas da mucosa bucal do rato, observou-se um fechamento epitelial acelerado, maior proliferação vascular e fibroblástica, apresentando efeito positivo no processo de reparo tecidual (RIBAS *et al*, 2006).

3.3 O gênero *Colletotrichum*

3.3.1. Caracterização Morfológica

O gênero *Colletotrichum* é um membro da ordem *Melaconiales*, da classe *Coelomycetes* (HAWKSWORTH, 1983), com ampla distribuição mundial e uma variedade de hospedeiros, sendo mais importante nos trópicos. Os fungos do gênero *Colletotrichum* Corda apresentam as espécies que estão entre os mais bem sucedidos fungos patógenos de plantas, causando significativos prejuízos econômicos às plantações das regiões tropicais, subtropicais e temperadas. (BAILEY e JEGER, 1992).

O seu teleomorfo é classificado como Ascomiceto gênero *Glomerella* Spauld e H.Schrenk e o anamorfo como Coelomyceto, o gênero *Colletotrichum*, causando certa confusão entre os taxonomistas que levam em consideração também caracteres morfológicos e o hospedeiro que seguem os conceitos taxonômicos propostos para o grupo por Von Arx (1957; 1970) e Sutton (1980) (TABELA 1).

Apresentam micélio interno e não possuem picnídios. Caracterizam-se pela formação de estruturas em forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas denominadas acérvulos. Os conidióforos são simples e alongados com conídios hialinos unicelulares, geralmente em forma de bastonete. Os conídios têm

exospório mucilaginoso, que após saírem pela epiderme rompida formam massas, mais ou menos compactas, chamadas de cirros de conídios. Os conídios permanecem nos acérvulos aderidos por uma massa mucilaginosa de polissacarídeos solúveis em água. Apesar destes esporos não serem estruturas de resistência, o micélio do fungo pode permanecer viáveis por longo período de tempo, em sementes, restos culturais, ou em infecções latentes em frutos (SUTTON, 1992).

Embora os limites de gênero sejam hoje relativamente bem definidos, o conceito de espécie do gênero *Colletotrichum* não está bem definido nem universalmente aceito (SUTTON, 1992). Devido à grande variedade de hospedeiros de um número de espécies de *Colletotrichum* e com o fato de várias espécies *Colletotrichum* poderem estar associados com um único hospedeiro tem se uma proliferação de nomes desnecessários (FREEMAN *et al.*, 1998).

A biologia molecular tem fornecido novas perspectivas para a sistemática, em particular na delimitação das espécies, bem como definir relações intra e inter-específicas, a utilização dessas técnicas biomoleculares levou à reclassificação de uma série de isolados de *C. gloeosporioides* como *C. acutatum* (PERES, *et al.*, 2002). A técnica de eletroforese de isoenzima também tem sido utilizada para discriminar entre espécies semelhantes de *Colletotrichum*, como *C. fragariae* Brooks e *C. gloeosporioides* (BONDE *et al.*, 1991).

Os fungos *Colletotrichum* são excelentes modelos para estudar a base molecular da estrutura de infecção fúngica, diferenciação e interações na planta (SUTTON, 1980; 1992).

TABELA 1. AMOSTRA REPRESENTATIVA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Colletotrichum*, OS SEUS ASSOCIADOS TELEOMORFICOS *Glomerella*, E UMA INDICAÇÃO DO HOSPEDEIRO (ADAPTADO DE SKIPP *et al.*, 1995).

<i>Colletotrichum</i>	<i>Glomerella</i>	Variedade de hospedeiros
<i>Espécies com esporos</i>		
<i>Acutatum</i>	-	Variados
<i>Coccodes</i>	-	<i>Solanaceae</i>
<i>Kahawae</i>	-	<i>Coffea</i> (café)
<i>Destructivum</i>	<i>Glycines</i>	<i>Fabaceae</i>
<i>Fragariae</i>	-	<i>Fragaria</i> (morango)
<i>Gloeosporioides</i>	<i>Cingulata</i>	<i>Plurivorous</i>
<i>Lindemuthianum</i>	<i>Lindemuthiana</i>	<i>Phaseolus</i> (feijão)
<i>Musae</i>	<i>Musarum</i>	<i>Musa</i> (bananas)

<i>Malvarum</i>	-	<i>Malvaceae</i>
<i>Orbiculare</i>	<i>Lagenaria</i>	<i>Cucurbitaceae</i>
		<i>Asteraceae</i>
<i>Espécies com esporos</i>		
<i>Caudatum</i>	-	<i>Poaceae</i>
<i>Capsici</i>	-	<i>Solanaceae</i>
<i>Circinans</i>	-	<i>Allium (cebola)</i>
<i>Dematium</i>	-	<i>Plurivorous</i>
<i>Falcatum</i>	<i>Tucumanensis</i>	<i>Saccharum</i>
<i>Graminicola</i>	<i>Graminicola</i>	<i>Poaceae (Milho)</i>
<i>Sublineolum</i>	-	<i>Poaceae (Trigo)</i>
<i>Truncatum</i>	-	<i>Fabaceae</i>
- Nenhuma forma teleomórfica associada ou ainda não foi reconhecido.		

O gênero *Colletotrichum* é um dos mais freqüentes e importantes gêneros de fungos patogênicos de plantas em todo o mundo, causando doenças em muitas culturas de regiões temperadas e tropicais, com prejuízos econômicos importantes em cereais, leguminosas, frutas e vegetais. (SUTTON, 1980; 1992; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; ALEXOPOLUS, 1996). *Colletotrichum* é o principal agente das antracnoses (SILVEIRA, 1981; AUGUSTIN e COSTA, 1971).

3.4. Marcadores moleculares do tipo RAPD

No ano de 1990, Williams *et al.* descreveram a técnica de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), que permite de maneira rápida, avaliar o grau de similaridade entre genótipos, em níveis inter e intraespecífico. De forma independentemente, Welsh e McClelland (1990), publicaram a *Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction* (AP-PCR), nome mais adequado para a técnica, pois os primers são arbitrários, com seqüências alvos desconhecidas.

O método de RAPD é a escolha para muitos estudos, uma vez que é sensível rápido e relativamente simples. Além de não requerer informações acerca da seqüência nucleotídica do DNA genômico. O RAPD vem sendo amplamente utilizado para os estudos de grupos de seres vivos, identificação taxonômica (LIU *et al.*, 1995; YUAN *et al.*, 1995; GUZMÁN *et al.*, 1999; BLANCO, 1999), análise de variabilidade da virulência em fungos fitopatogênicos (COOKE *et al.*, 1996; FERNANDEZ e HANLIN, 1996; MOSTAFA *et al.*, 2002; ARAYA, ALLEYENE e STEADMAN, 2004; BELABID *et al.*, 2004), caracterização de raças (GUTHRIE *et al.*, 1992; JIMENEZ-GASCO, PÉREZ-ARTÉS e JIMÉNEZ-DIAZ, 2001), variabilidade

inter e intraespecífica de populações de diferentes regiões (LIEW e IRWIN, 1994; GUZMÁN *et al.*, 1995; JAMIL *et al.*, 2000; ROY, SIMON e LAPOINTRE, 2000; STRINGARI, 2004 e também podem ser utilizados para evidenciar mecanismos de recombinação em fungos filamentosos (DALZOTO *et al.*, 2003).

A técnica de RAPD tem sido muito usada para verificar a variabilidade genética em fungos endofíticos (MANULIS *et al.*, 1993; HOLMES; ECKERT; PITT, 1994; LIEW; IRWIN, 1994; MEIJER; MEGNEGNEAU; LINDERS, 1994; NICHOLSON; REZANOON, 1994; RIBEIRO, 1995; LONGO, 1996; GUIMARÃES, 1998).

Em *Citrus sp*, Glienke-Blanco *et al.* (2002) encontraram uma alta variabilidade genética em isolados de *Guignardia citricarpa*, verificando a existência de pelo menos duas espécies geneticamente diferenciadas, uma sendo endofítica, *G. mangiferae*, e outra, *G. citricarpa*, causadora da mancha preta de citros (MPC).

Manulis *et al.* (1993) isolaram linhagens de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*, de cravo, constatando diferenças entre as patogênicas e não patogênicas por meio de marcadores RAPD. Com RAPD, Ribeiro (1995) caracterizou 17 isolados do gênero *Penicillium* endófitos provenientes de *Zea mays*, o que permitiu separá-los em grupos.

Penna (2000) em erva-mate (*Ilex paraquariensis* STHIL), analisou a variabilidade genética de vinte e quatro isolados do fungo endofítico *Phyllosticta sp.* Seymour *et al.* (2004) estudaram 49 isolados dos fungos endofíticos *Cylindrocarpon destructans* e *Heliscus lugdunensis*, relacionando a produção de metabólitos com a diversidade genotípica por meio de RAPD e sequenciamento de ITS de rDNA, Pillegi (2006) analisou a variabilidade genética em 15 espécies de *Colletotrichum* e Figueiredo 2006 utilizou a técnica para caracterizar isolados de *Pestalotiopsis*.

A técnica foi usada para caracterização de *C. gloeosporioides* (PERES *et al.*, 2002), para identificação de isolados desta espécie, que se diferenciam pelos sintomas causados na planta hospedeira (MUNAUT *et al.*, 1998), e também para identificação de isolados com agressividades diferentes, como aqueles de *Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr.) *Primers* específicos são usados na identificação de patógenos como *Colletotrichum* de *Passiflora* (AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003).

3.5. RAPD em espécies do gênero *Colletotrichum*

Em 1998, Galvão isolou fungos endofíticos de folhas aparentemente saudáveis, identificados como *Glomerella cingulata* e seu anamorfo *Colletotrichum* sp entre outros, de *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides*, e *Scleria pterota*, , onde o endófito mais freqüente isolado em *P. phaseoloides* e *S. pterota* foi *G. Cingulata*, que foram detectados nos três hospedeiros e oito primers foram utilizados para a determinação dos perfis de RAPD. A distância genética entre os isolados de *T. grandiflorum*, *P. phaseoloides* e *S. pterota* foi 54,28%, 70,16% e 67,81% e a proporção de loci polimórfico foi 0,91; 0,94 e 0,93 respectivamente. Os 30 fungos foram agrupados em seis grupos, e os isolados de *T. grandiflorum* apresentou maior similaridade genética.

Avaliando o grau de diversidade genética em 127 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em *Stylosanthes guianensis*, por meio de marcadores moleculares RAPD e RFLP, onde foram utilizados nove *primers*, que revelaram um total de 80 bandas, destes isolados, 63 foram agrupados em 13 linhagens distintas, geralmente relacionadas com a origem geográfica. Após a análise de *Southern blot* dos 127 isolados um total de 23 fragmentos de hibridização foram revelados, resultando 41 padrões de fingerprint entre os mesmos. Análises estatísticas das relações entre as variáveis de RFLP e RAPD mostraram que as duas medidas de variação genotípica estão concordantes (KELEMU *et al*,1999).

Investigações por meio de análise de RAPD e compatibilidade vegetativa as relações entre diversos grupos morfológicos de *Colletotrichum acutatum* coletados de *Lupinus* spp da Nova Zelândia, Canadá, França e Inglaterra, e de *Pinus radiata* na Nova Zelândia e Austrália foram encontradas diferenças genéticas confirmadas com os dados morfológicos (LARDNER *et al.*, 1999).

Em vários países, *Colletotrichum* patogênicos de morango foram isolados e estudados por meio de marcadores RAPD desses isolados a maior variabilidade foi em *C. acutatum*, onde foram observados 15 padrões de RAPD diferentes, formando dois grupos principais após análise por agrupamentos UPGMA. *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* que eram espécies morfológicamente indistinguíveis, puderam ser diferenciadas por RAPD, porém com menor variabilidade genética (MARTINEZ-CULEBRAS *et al.*, 2002)

Com 25 isolados de *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) de *Hevea brasiliensis* (borracha), foi feito um estudo com marcadores moleculares RAPD em patógenos de folhas responsáveis por três tipos de lesões diferentes. Os perfis de RAPD dos isolados que causavam um tipo de sintoma eram facilmente distinguíveis dos que originavam os outros dois tipos (SAHA *et al.*, 2002),

A antracnose e a ramulose são doenças do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) causadas, respectivamente, por *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, sendo a ramulose a mais importante sob o ponto de vista de prejuízos causados, transmitida por fungos que estão na semente, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas moleculares que correlacione patogenicidade com marcadores bioquímicos e moleculares de DNA/RAPD, visando à identificação e diferenciação do complexo *Colletotrichum*. Dos 10 isolados, sendo 7 para ramulose e 3 para antracnose pelo teste de patogenicidade, os marcadores bioquímicos não se mostraram eficientes para a distinção dos isolados causadores da ramulose e da antracnose. Entretanto o valor de similaridade encontrado para os dois grupos foi de 51,7%, quando analisado na análise de RAPD, confirmando a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos (SILVA-MANN *et al.* 2002).

Dauch *et al.* (2003) desenvolveram marcadores moleculares RAPD para reconhecer seletivamente e detectar a presença da linhagem 183088 do fungo *Colletotrichum coccodes* no controle biológico da espécie-alvo *Abutilon theophrasti* e em amostras de solo.

Analisando a variação em isolados de *Colletotrichum* de frutos de café de vários locais da Etiópia, sob o aspecto morfológico, tamanho de conídios, patológicos e marcadores RAPD e que os estudos patológicos de agressividade sugeriram duas espécies diferentes, *C. gloeosporioides* e *C. kahawae*, porém quando analisadas molecularmente mostraram pouca variabilidade entre os isolados (DERSO e WALLER, 2003).

Lu *et al.* (2004) estudaram a diversidade e especificidade de hospedeiro de linhagens endofíticas de *Colletotrichum* provindas de 12 espécies de plantas da Reserva Florestal de Iwokrama, na Guiana. Por meio de RAPD e sequenciamento de ITS de rDNA, bem como caracterização morfológica das colônias, puderam concluir que a maioria das linhagens pertencia a uma das duas espécies, *C. gloeosporioides* e *C. honinense*.

Em 37 isolados de *Colletotrichum graminicola*, patógeno causador da antracnose do sorgo, provenientes de quatro regiões do Brasil geograficamente distintas Valério *et al.* (2005) avaliaram a diversidade genética por marcadores RAPD e RFLP-PCR, foram ainda analisadas as características de virulência em um grupo de 10 genótipos diferenciais de sorgo. As análises de RAPD revelaram 143 bandas polimórficas que agruparam os isolados de acordo com suas origens geográficas, mas não por seus fenótipos de virulência. Foi observado um polimorfismo molecular entre isolados da mesma raça. Não foi verificada associação entre fenótipos de virulência e perfis moleculares.

Munaut *et al.* (2002) analisaram 119 isolados mexicanos, dois australianos (A e B) e dois africanos (A e B) de *C. gloeosporioides*, provenientes da planta nativa *Stylosanthes*, por meio de RAPD e ITS. Estudos anteriores destes e de outros autores levaram à proposição de uma diferenciação taxonômica infraespecífica, como *C. gloeosporioides f. stylosanthis f. sp. stylosanthis* e *f. sp. guianensis*.

Analisando 37 isolados de *Colletotrichum capsici*, patógenos de *Capsicum annuum* L. (pimenta da Guiné), divididos em cinco grupos com base nas características morfológicas e de cultura (Cc-I, Cc-II, Cc-III, Cc-IV e Cc-V), não foram observadas diferenças significativas no formato e tamanho dos conídios. As relações genéticas entre os cinco grupos foram investigadas por meio de RAPD, confirmando os cinco agrupamentos dos isolados de *C. capsici* (SHARMA *et al.*, 2005).

3.6. RNA Dupla fita em fungos

A presença de RNAs dupla fita em fungos tem sido relacionada a diversas alterações fenotípicas nos seus hospedeiros. Em fungos fitopatogênicos, vários autores têm relacionado à existência destes elementos com virulência alterada, em geral, reduzida. A existência destas micoviroses nestes fungos também vem sendo relacionada com outras alterações morfológicas, como variações nas taxas de crescimento e reprodução destes fungos (KAVA-CORDEIRO, 2004).

RNAs dupla fita (RNA_{df}) são comumente encontrados em fungos e podem estar associados a partículas virais (BUCK, 1986). A maioria desses micovírus existe como simples partícula contendo um único RNA_{df} em um capsídio protéico composto por polipeptídeos (CASTRO *et al.*, 1999). Outros RNA_{df} não são

encapsulados e parecem estar associados à membrana do fungo hospedeiro (MARTINS *et al.*, 1999).

A organização desses elementos é complexa. Existem diferenças significativas em tamanho e forma de apresentação do genoma (íntegro ou fragmentado), o que torna necessário vários grupos para acomodá-los (NUSS; KOLTIN, 1990).

Mertens (2004) em recente revisão, relatou cinco famílias de vírus de RNA_{df} que vem sendo identificadas infectando fungos. São composta por três famílias exclusivas de fungos: *Hypoviridae*, genoma de um segmento, com vesículas de 50 a 80 nm que não possuem capsídio protéico; *Totiviridae*, genoma de um segmento e com capsídio icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro; *Chrysoviridae*, genoma com quatro segmentos, com capsídio protéico icosaédrico de 30 a 40 nm de diâmetro; E uma família mais numerosa de vírus de RNA_{df}, sendo que os hospedeiros destes vírus podem pertencer a diferentes táxons, como: fungos, plantas, artrópodos, peixes, répteis, pássaros e mamíferos: *Partitiviridae*, genoma com dois segmentos, com capsídio protéico icosaédrico com 30 a 40 nm de diâmetro (hospedeiros de vírus desta família podem ser fungos e plantas); *Reoviridae*, genoma com 10,11 ou 12 segmentos, empacotados em capsídios protéicos icosaédricos de 70 a 90 nm de diâmetro.

Os micovírus são regularmente transmitidos através do contato citoplasmático pela fusão de hifas. Partículas virais também podem ser transmitidas para os esporos durante o desenvolvimento do fungo, mas, aparentemente não podem infectar através da parede celular intacta (TIAGO, 2001). Segundo Buck (1986), os micovírus não têm habilidade de lisar as células do hospedeiro, sendo que o único mecanismo natural de transmissão é o citoplasmático, refletindo em uma gama limitada de hospedeiros, já que fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento geneticamente regulado que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. Este sistema de incompatibilidade vegetativa, de acordo com McCabe, Pfeiffer e Van Alfen (1999), limita a transmissão dos micovírus através da reprodução sexual em populações fúngicas.

A identificação das bandas extras, correspondentes à RNA dupla fita, é relativamente simples. Deve ser utilizado um protocolo de extração de ácidos nucléicos e posterior visualização destes ácidos nucléicos em gel de agarose. A confirmação da natureza das bandas extras, quando encontradas, geralmente é feita

com tratamentos com DNase e RNase. Alguns fungos como o *Uncinula necator*, fitopatogênico e biotrófico obrigatório, exigem adaptações no protocolo convencional conforme descrito por Délye e Corio-Costet (1998). Pesquisas indicam que essas partículas virais estão presentes em, aproximadamente, 30% de todas as espécies de fungos (BUCK, 1986).

Geralmente, RNAs dupla fita são latentes ou crípticos mas em alguns casos, fenótipos particulares são observados em fungos que contém esses micovírus (CASTRO *et al.*, 1999). A presença de certos elementos de RNAdf está fortemente correlacionada com alterações na patogenicidade, principalmente hipovirulência (BOLAND, 1992; DALZOTO *et al.*, 2006). Todavia, infecções por RNAdf podem, também, alterar a morfologia da colônia e reduzir a taxa de crescimento e esporulação de seus hospedeiros (ELLISTON, 1982). Boland (1992) cita uma possível associação entre RNAdf e hipovirulência no fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, já que isolados virulentos não apresentaram esses elementos e a transmissão de RNAdf ocorreu associada com o fenótipo de hipovirulência para as linhagens virulentas. Em outro estudo com *S. sclerotiorum*, Zhou e Boland (1999) verificaram que linhagens hipovirulentas (com RNAdf) produziam menor quantidade de massa micelial do que linhagens virulentas (livres de RNAdf) em meio de batata líquido (PDB). Também as linhagens hipovirulentas apresentaram uma menor produção e/ou um atraso na produção de ácido oxálico em comparação com linhagens virulentas, especialmente durante os primeiros dias de cultura (3 a 7 dias). Já para a espécie *Sclerotinia minor*, Melzer e Boland (1996) verificaram que a presença de RNAdf não necessariamente induz a hipovirulência, uma vez que alguns isolados virulentos também apresentaram esses elementos. Entretanto, todos os isolados hipovirulentos continham RNAdf.

Comparando linhagens de *Chalara elegans* que continham RNAdf, quanto ao crescimento, patogenicidade e sobrevivência no solo, Punja (1994) verificou que a presença de múltiplos elementos de RNAdf no fungo estava associada com um aumento na esporulação, alteração da morfologia da colônia e redução no crescimento e na patogenicidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Howitt *et al.* (1995) em *Botrytis cinerea*. Estes autores compararam várias linhagens contendo RNAdf com linhagens livres destes elementos e encontraram uma diferença na taxa de crescimento e virulência, sendo menores para o grupo contendo RNAdf. Castro *et al.* (1999) observaram neste mesmo fungo que células

infectadas com vírus apresentaram um importante grau de degeneração celular em seu citoplasma, inclusive com o desaparecimento de organelas.

Chu *et al.* (2002) evidenciaram a presença de RNAdf em linhagens de *Fusarium graminearum* e, então, analisaram com mais detalhes uma destas linhagens, verificando mudanças morfológicas como redução do crescimento, aumento da pigmentação, redução da virulência para trigo e decréscimo na produção de toxinas. Além disso, o RNAdf foi transmitido para uma linhagem livre deste elemento por fusão de hifas e a linhagem receptora adquiriu o vírus associado ao fenótipo da linhagem doadora. Dalzoto em 2006 relatou alterações relacionadas ao RNAdf em *Beauveria bassiana*, esses elementos foram relacionados a hipovirulência desse fungo, onde a média de mortalidade contra o inseto *Euschistus heros* foi reduzida em linhagens contendo RNAdf quando comparado com a isogênica livre de RNAdf.

Embora haja um grande número de relatos sobre RNAs dupla fita em fungos, o significado biológico dessas micoviroses, incluindo sua influência na patogenicidade e/ou influência no fenótipo do hospedeiro, ainda é incerto para a maioria dos casos. Conseqüentemente, estas infecções têm gerado grande interesse e têm se tornado alvo de extensas pesquisas, especialmente em fitopatógenos onde há um grande potencial na utilização de RNAs dupla fita como agentes de controle biológico, utilizando a hipovirulência que estes vírus podem conferir a estes fungos (KAVA-CORDEIRO, 2004).

Vários pesquisadores têm estudado a correlação entre variações na patogenicidade, marcadores moleculares e compatibilidade vegetativa de isolados de espécies fúngicas. Wright *et al.* (1996) evidenciaram uma alta correlação entre agrupamentos obtidos com dados de patogenicidade, compatibilidade vegetativa e marcadores RAPD em *Fusarium oxysporum*. Até então, a classificação de *F. oxysporum* em *formae speciales* e raças era feita de acordo com o hospedeiro e o cultivar, respectivamente. Em trabalhos realizados por Steenkamp *et al.* (1998), utilizando a espécie *Sphaeropsis sapinea*, os autores identificaram quatro linhagens contendo RNAdf, destas, duas linhagens apresentaram um crescimento mais lento e as outras duas um crescimento mais regular. Estas linhagens foram testadas quanto à virulência, e esta se apresentou menor nas duas linhagens com crescimento mais lento. Dessa forma, a redução da virulência em *S. sapinea* apresentou-se

positivamente correlacionada com crescimento mais lento *in vitro*, sugerindo que a presença de RNAdf pode não estar relacionado a essas características.

Em análises feitas por Zabalgogezcoa *et al.* (1998), utilizando *Epichloe festucae*, não observaram diferenças com relação à virulência entre linhagens infectadas e não infectadas por RNAdf. Resultados diferentes foram encontrados por Ahn e Lee (2001) que identificaram em *Nectria radicularis* RNAdf de 4 tamanhos diferentes (6,0, 5,0, 2,5, e 1,5 Kb). Em testes de cura, verificaram que o RNAdf de 6,0 Kb está associado com altos níveis de virulência e esporulação, sugerindo que este RNAdf é um regulador positivo da virulência neste fungo.

Satélites de certos RNA dupla fita são responsáveis pelo *sistema matador*, que fazem com que seu hospedeiro, secretem toxinas, como ocorre em *Saccharomyces cerevisiae* (WRIGHT *et al.*, 1996) e *Ustilago maydis* (SHELBOURN; DAY; BUCK, 1988). As linhagens matadoras contêm segmentos de RNAdf encapsulados que são responsáveis por informações requeridas para replicação e para a estrutura viral, e também por codificar polipeptídeos tóxicos e provavelmente por um papel na imunidade do fungo para a toxina que ele produz.

Em fungos entomopatogênicos, Leal *et al.* (1994) realizaram bioensaios utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae* contra o afídio *Myzus persicae* e não detectaram diferenças de virulência entre a linhagem com RNAdf e a linhagem isogênica (sem o RNAdf), ao contrário do que é descrito para a maioria dos fitopatógenos. Também Tiago (2001) analisou a correlação entre a presença de RNA dupla fita e produção de proteases degradadoras de cutícula, secreção de proteína total e produção de conídios em linhagens isogênicas de *Metarhizium anisopliae* variedade *acridum* (= *Metarhizium flavoviride*) e *Paecilomyces fumosoroseus*. Neste trabalho, não foi encontrada correlação entre os parâmetros analisados com a presença ou ausência de RNA dupla fita, sugerindo que a infecção deve ser latente nesses fungos. Em bioensaio com o inseto *Euchistus heros*, linhagens com e sem RNA dupla fita de *M. anisopliae* apresentaram desempenho semelhante na mortalidade deste inseto (RIBEIRO, 1995). Na espécie *M. flavoviride*, Martins *et al.* (1999) verificaram que linhagens com RNAdf não foram associadas com hipovirulência em teste contra o gafanhoto *Ramatocerus schistocercoides*.

Resultados diferentes foram obtidos por Frazzon *et al.* (2000). Estes autores analisaram a produção de proteases e quitinases em linhagens de *Metarhizium anisopliae* com e sem RNA dupla fita e verificaram que as linhagens com RNAdf

secretavam estas enzimas em menor quantidade. Gimenez-Pecchi *et al.* (2002) também observaram que as linhagens de *M. anisopliae* com RNA dupla fita secretavam endoquitinases em menor quantidade que as linhagens sem RNA dupla fita. SANTI *et al.* (2000) também verificou que as mesmas linhagens com RNA dupla fita investigadas por Gimenez-Pecchi *et al.* (2002) também foram, em regra geral, menos infectivas contra o carrapato *Boophilus microplus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Dalzoto (2006) com o, entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Em bioensaio com o percevejo marrom da soja, *Euchistus heros*, uma linhagem com RNAdf foi menos virulenta que a mesma linhagem curada deste vírus, evidenciando o caráter de hipovirulência deste vírus neste fungo.

Em bioensaio com o fungo *Paecilomyces fumosoroseus*, Azevedo *et al.* (2000) também não encontraram nenhuma diferença estatística entre o isolado com RNA dupla fita e a linhagem isogênica sem o RNAdf, indicando que os RNAs dupla fita não causam hipovirulência neste fungo.

São poucos os trabalhos que descrevem a presença de RNAdf em fungos endofíticos. Zabalgogezcoa *et al.* (1998), verificaram a presença de RNAdf no fungo endofítico *Epichloë festucae*, obtido da planta assintomática *Festuca rubra*. Os autores não detectaram diferenças na morfologia das colônias entre isolados com RNAdf daqueles livres de RNAdf.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Foram utilizados microrganismos endofíticos isolados de plantas de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), localizadas no Campus da Universidade Federal do Paraná e do município Guaraqueçaba, litoral do Paraná. A coleta do material foi realizada com uma seleção aleatória das plantas adultas, sendo escolhidas as folhas de aspecto jovem e sadio.

4.2. Meios de cultura

4.2.1 Ágar de Batata e Dextrose (BDA)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL
pH=6,8	

As batatas foram cortadas e cozidas em pequenos pedaços por uma hora em meio litro de água destilada, ao caldo resultante após filtração, foi adicionada dextrose e completado com água destilada até 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

Alternativamente foi utilizado o meio BDA pronto Merck® na concentração de 39 g/L.

4.2.2 Meio Líquido de Batata e Dextrose (BDL)

Batatas	200 g
Dextrose	20 g
Água destilada	q.s.p 100 mL

pH=6,8

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada por 60 minutos. Após filtração, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

4.2.3 Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)

Dextrose	20 g
Peptona	10 g
Agar	20 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL
pH=6,8	

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada, sob agitação, exceto o ágar. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

4.2.4 Caldo de Extrato de Malte (MEB)

Extrato de malte	20 g
Peptona	1 g
Glucose	20 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL
pH= 6,8	

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada, sob agitação. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

4.2.5 Meio Seletivo para Isolamento de Actinomicetos (AC) (KÜSTER; WILLIAMS, 1964)

Amido (ou glicerol)	10 g
Caseína	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O 0,05 g	0,05g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Ágar	18 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL
pH=7,0–7,2	

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada, sob agitação, exceto o ágar. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

4.2.6 Ágar Nutriente (AN)

Peptona de gelatina	5 g
Extrato de carne bovina	3 g
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada, sob agitação, exceto o ágar. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

4.2.7 Ágar Müller Hinton (MHA)

Infusão de carne bovina	30 g
-------------------------	------

Peptona de caseína ácida	17,5 g
Amido	1,5 g
Ágar	17 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada, sob agitação, exceto o ágar. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

4.2.8 Caldo Nutriente (NB)

Peptona de gelatina	5 g
Extrato de carne bovina	3 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada, sob agitação, exceto o ágar. O volume foi completado com água destilada para 1000 ml. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

4.2.9 Meio Completo (MC)

NaNO ₃	6 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,02 g
ZnSO ₄	0,02 g
Glucose	10 g
Peptona	2 g
Extrato de levedura	2 g

Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1 mL
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p 1000mL
pH = 5,8	

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada, sob agitação, exceto o ágar. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N antes de adicionar o ágar.

4.2.10 Meio Completo Líquido (MCL)

NaNO ₃	6 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,02 g
ZnSO ₄	0,02 g
Glucose	10 g
Peptona	2 g
Extrato de levedura	2 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1 mL
Água destilada	q.s.p 1000 mL
pH = 5,8	

Todos os reagentes foram adicionados em água destilada, sob agitação. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N.

OBS.: Todos os meios de cultura foram autoclavados antes do uso, a 120 °C, 1 atm, por 20 minutos.

4.3. Soluções e tampões

4.3.1 Clorofil

Clorofórmio	240 mL
Álcool isoamílico	10 mL

4.3.2 Clorofane

Fenol	100 mL (50%)
Clorofórmio	100 mL (50%)

4.3.3 Lactofenol Azul de Algodão

a) Lactofenol incolor

Fenol	20 mg
Ácido Láctico	40 mL
Glicerina	40 mL
Água destilada	20 mL

b) Lactofenol Azul Algodão

Azul algodão	0,5 g
Água destilada	50 mL

Para o preparo da solução final, foram adicionados 100 mL de lactofenol, 5 mL de azul algodão e 20 mL de ácido acético glacial.

4.3.4 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TBE 1X	100 mL

A agarose foi acrescentada ao tampão TBE. A suspensão foi aquecida no forno de microondas até a total dissolução da agarose. A solução foi aplicada somente quando atingiu uma temperatura aproximada de 37°C.

4.3.5 Gel de Agarose (1,5%)

Agarose	1,5 g
Tampão TBE 1X	100 mL

A agarose foi acrescentada ao tampão TBE. A suspensão foi aquecida no forno de microondas até a total dissolução da agarose. A solução foi aplicada somente quando atingiu uma temperatura aproximada de 37°C.

4.3.6 RNase

A enzima foi preparada na concentração de 10 mg/mL, em 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 15 mM de NaCl. Aquecida a 100 °C por 15 minutos e estocada a -20 °C.

4.3.7 S1 nuclease (Invitrogen)

A enzima foi fornecida na concentração de 100 U e estocada a 20°C.

4.3.8 DNase I (Invitrogen)

A enzima foi fornecida na concentração de 1 U/μL e estocada a 20°C.

4.3.9 Solução de Brometo de Etídio

O brometo de etídio foi dissolvido a 1% (p/v) em água destilada, mantido sob agitação por algumas horas e armazenado a temperatura ambiente, protegido de luz.

4.3.10 Tampão da Amostra (6X)

Azul de bromofenol 3%	1 mL
Glicerol	1,035 mL
Água destilada	5 mL

4.3.11 Tampão de Corrida TBE 10X pH 8,0

Trizma base	54 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	27,5 g
EDTA	4,65 g
Água destilada	500 mL

A solução foi autoclavada e armazenada a temperatura ambiente. No momento do uso, foi diluída 10 vezes com água ultra pura.

4.3.12 Tampão de Extração de DNA (TE) (preparado no momento do uso)

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA pH 8,0	25 mM
SDS (p/v)	1%

4.3.13 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl pH 7,6	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

A solução foi autoclavada e armazenada sob refrigeração a 4°C.

4.3.14 Solução Estoque de Tetraciclina

Tetraciclina	1g
Etanol absoluto	20 mL

A solução foi preparada sob agitação e armazenada em frasco escuro a -20°C .

4.3.15 Solução de Vitaminas

Ácido nicotínico	100 mg
Ácido p-aminobenzóico	0,2 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50 mg
Riboflavina	100 mg
Tiamina	50 mg
Água destilada	q.s.p 100 mL

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos, e armazenada em um frasco escuro sob refrigeração a 4°C .

4.3.16 Solução de Tween 80 a 0,1% (v/v)

Tween 80	0,1 mL
Água destilada	q.s.p 100 mL

A solução foi autoclavada e armazenada sob refrigeração a 4°C .

4.3.17 Solução Salina a 0,85%

NaCl	850 mg
Água destilada	q.s.p 100 mL

A solução foi autoclavada e armazenada sob refrigeração a 4°C .

4.3.18 Acetato de Sódio (3M)

Acetato de sódio	40,81 g
Água ultrapura autoclavada	q.s.p 100 mL

O sal foi dissolvido em metade da quantidade da água necessária para a solução, ajustou-se o pH para 5,4 com ácido acético glacial e completou-se o volume. A solução foi armazenada sob refrigeração a 4°C.

4.3.19 Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com *Hind III* - Invitrogen)

O marcador de peso molecular do DNA foi fornecido concentrado e no momento do uso. Diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 1 µL do tampão da amostra: 4 µL de água ultrapura esterilizada. Na corrida eletroforética foi utilizado 5 µL do marcador.

4.3.20 Marcador de peso molecular (DNA *Ladder* 100pb - Ludwig Biotec®)

O marcador de peso molecular foi fornecido concentrado e no momento do uso diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 2 µL do tampão da amostra: 7 µL de água ultrapura esterilizada. Na corrida eletroforética foram utilizados 15 µL do marcador.

3.3.20 Oligonucleotídeos (Invitrogen®)

Adicionou-se 10 mM de Tris-HCl pH 7,0 aos oligonucleotídeos, inicialmente em forma de precipitados liofilizados, para obter uma solução estoque com concentração igual a 50 µM. No momento do uso, a solução estoque foi diluída para obter uma solução de concentração 4 µM.

4.4 Métodos

4.4.1 Isolamento dos microrganismos endofíticos

A metodologia utilizada para o isolamento dos microrganismos endofíticos está descrita em Petrini (1991) com algumas modificações. Foram coletadas folhas com pecíolos, de vários indivíduos devidamente identificados, acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e levadas ao laboratório, sendo mantidas sob refrigeração por até 24 horas. Para desinfestação da superfície do material, a fim de se eliminarem os microrganismos epifíticos, as folhas foram lavadas em água

corrente abundante. Os pecíolos foram parafinados para evitar a entrada da solução esterilizante nos tecidos internos das folhas, desta forma preservando os endofíticos a serem isolados. Em seguida, as folhas foram imersas em água destilada esterilizada por 1 minuto, etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3%, por 4 minutos, novamente lavadas em etanol 70% por 30 segundos, e por último em água destilada esterilizada por 6 minutos.

O procedimento foi repetido por mais duas vezes, utilizando tempos diferentes de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl), de 7 e 10 minutos. As folhas foram cortadas em seis fragmentos, utilizando um bisturi esterilizado, sob assepsia. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri com diferentes meios de cultura.

Os isolados foram estocados sob refrigeração a 4°C, em frascos com meio inclinado contendo Ágar Nutriente, se tratando de bactérias. BDA para fungos e os actinomicetos no Meio Seletivo para Actinomicetos.

4.4.2 Conservação dos isolados endofíticos

Todos os isolados endofíticos foram nomeados e estocados de duas maneiras:

- Em frascos contendo meio inclinado, mantidos a 4 °C, realizando-se repiques mensalmente.
- Para os fungos utilizou o Método de Castelani (ARAÚJO *et al.*, 2002): Em tubos contendo 1,5 ml de água destilada esterilizada com discos de 5 mm de meio contendo micélios e/ou conídios. Repetindo-se o procedimento a cada três meses.

4.4.3 Identificação dos microrganismos endofíticos

Os fungos endofíticos foram identificados por meio de observação macroscópica da colônia e microscópica das estruturas de reprodução após crescimento em meio BDA, em diferentes condições de temperatura e luminosidade.

As bactérias endofíticas foram purificadas por semeadura em estrias em meio NA e submetidas à coloração de Gram (KONEMAN *et al.*, 2001).

4.4.5 Obtenção de colônias monospóricas

Para obtenção de colônias monospóricas, os fungos endofíticos foram inoculados em meio BDA a 28°C. Após 10 a 14 dias, com auxílio de um palito esterilizado, foi retirada uma pequena gotícula da mucilagem presente sobre as colônias e imerso em 5 ml de solução de Tween 80 a 0,1%. A suspensão de esporos foi submetida à agitação contínua durante 1 minuto, centrifugada a 10000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspendido com 500 µl de solução salina a 0,85%. O volume foi completado para 14 µl com solução salina a 0,85%. Em *Câmara de Neubauer* foram contados os esporos e a suspensão foi diluída até conter 10^6 a 10^7 esporos por ml. Apenas 100 µl da solução de esporos foram inoculadas em placas de Petri, que foram mantidas em estufa a 28°C. Ao germinarem os esporos foi realizado o isolamento de colônias monospóricas para posterior extração de DNA.

Naqueles casos onde não houve a formação de estruturas mucilaginosas, as colônias monospóricas foram obtidas de placas de Petri com crescimento de colônias submetidas às mesmas condições de tempo, temperatura e meio de cultura relatos acima. Com auxílio de um bisturi esterilizado, o micélio coletado foi imerso em 5 ml de solução de Tween 80 a 0,1% , macerado com bastão de vidro esterilizado, filtrado em seringa com lã de vidro autoclavada, lavado com solução salina a 0,85% e coletado em tubo tipo Falcon de 15 ml. O volume foi completado para 14 ml com solução salina a 0,85%. A solução foi centrifugada a 3500 rpm por 4 minutos, descartando-se o sobrenadante e suspendendo-se o precipitado com 500 µl de solução salina a 0,85%. Em *Câmara de Neubauer* foram contados os esporos e a suspensão foi diluída até conter 10^6 a 10^7 esporos por mL. Apenas 100 µl da solução de esporos foram inoculadas em placas de Petri, que foram mantidas em estufa a 28°C. Ao germinarem os esporos foi realizado o isolamento de colônias monospóricas para posterior extração de DNA.

4.4.6 Caracterização morfológica molecular de *Colletotrichum* spp.

Discos de micélio (Ø12 mm) provenientes de possíveis colônias de *Colletotrichum* spp., com 7 dias de crescimento em BDA (Merck®), foram inoculados no centro de placas de Petri em meio de cultura BDA (Merck®). As placas foram incubadas durante 6 dias, na ausência de luz a 22°C. Do 4º ao 6º dia foi realizada a

mensuração do diâmetro das colônias. Os ensaios foram realizados em 6 repetições.

Após 14 dias de crescimento das colônias, nas placas que havia a produção de mucilagem de coloração alaranjada, característica para a maioria das linhagens de *Colletotrichum* isoladas, foi retirada uma pequena quantidade da mucilagem para observação em microscopia ótica. Os esporos foram mensurados com o programa de análise realizada usando o programa UTHSCSA ImageTool, desenvolvido na Universidade do Texas(Health Science Center/San Antonio,Texas) e disponível a partir da Internet. Foi realizada mensuração de 15 esporos por isolado.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 6 repetições. As análises de variância foram realizadas nas etapas de mensuração dos esporos e do diâmetro das colônias. Sempre que foi encontrado um valor significativo em relação ao teste F, completou-se a análise com teste de Tukey para comparação das médias utilizando software ASSISTAT (SILVA, 1996; SILVA, 2002).

4.4.7 Caracterização Molecular de *Colletotrichum* spp.

4.4.7.1 Extração de DNA

O DNA genômico dos isolados foram extraídos utilizando o protocolo de RAEDER e BRODA (1985), modificado por BLANCO (1999), adaptando-o quando necessário. Os isolados endofíticos de *Colletotrichum* spp. foram cultivados em meio BDA durante três dias a 28°C. O micélio foi coletado raspando a colônia com material esterilizado. O micélio retirado foi liofilizado e em seguida foi macerado com adição de nitrogênio líquido. O material foi pesado e para cada grama de micélio, foi acrescentado 1 ml de Tampão de Extração (TE). A solução foi homogeneizada e incubada durante 20 minutos no banho-maria a 70°C. Na capela, foi acrescentado um volume de fenol saturado, as fases foram misturadas e centrifugadas durante 15 minutos a 5000 rpm. A fase aquosa foi retirada e colocada em um novo tubo. A este foi adicionado um volume de Clorofane, a suspensão foi centrifugada novamente, sob as mesmas condições anteriores. A fase aquosa foi coletada, como na etapa anterior e adicionada um volume de Clorofil, repetindo-se o processo de centrifugação, sob as mesmas condições. A fase aquosa foi coletada em um novo

tubo e foi adicionado etanol absoluto, o material foi incubado a -20°C , durante uma hora. Após este período, a suspensão foi centrifugada (10000 rpm. por 20 min.), o sobrenadante foi desprezado. No tubo foram acrescentados 500 μL de etanol 70% e centrifugado a 10000 rpm, durante 5 minutos. O álcool 70% foi descartado e o tubo foi invertido sobre uma folha de papel absorvente para secar a borda. O mesmo secou aberto a uma temperatura de 37°C durante 30 minutos. O DNA foi ressuspensionado com 200 μl de tampão TRIS-EDTA, o material permaneceu durante uma hora sobre a bancada e depois foi estocado a -20°C .

A concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando como padrão de peso molecular o DNA do fago λ clivado com *Hind* III em com concentração conhecida. Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, observado sobre transiluminador de ultravioleta e fotodocumentado.

4.4.7.2 Análise da variabilidade genética por RAPD

Inicialmente foi otimizada a reação de amplificação, testando as concentrações de DNA e cloreto de magnésio. Foram ensaiadas concentrações de DNA de 25 a 200 ng/reação, concentrações de cloreto de magnésio de 2 e 3 mM e selecionados os oligonucleotídeos. Para cada reação foram adicionados: água milli-Q autoclavada; tampão PCR 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 10 pMol de oligonucleotídeo; 3 mM de MgCl_2 ; 1,5 U de Taq DNA polimerase; e 50 ng de DNA, totalizando um volume final de 25 μl (TABELA 2). Foi utilizado o termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient®) sendo cada reação submetida a 40 ciclos após desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos. Cada ciclo consistiu de 1 minuto a 94°C , 1 minuto e 30 segundos a 37°C e 2 minutos a 72°C . Ao término dos 40 ciclos foi realizada uma extensão final de 3 minutos a 72°C . Para a análise do polimorfismo, os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% e corados por 15 minutos com solução de Brometo de Etídio, observados em transiluminador de UV e fotodocumentados. O DNA *ladder* de 100 pb foi utilizado como marcador de peso molecular.

TABELA 2 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO RAPD DE *Colletotrichum* spp. E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS

Componentes	Concentração (estoque)	Concentração (final)	Vol. da reação (µL)
Água ultrapura	-	QSP	11,2
Tampão	10 X	1X	2,5
MgCl ₂	50Mm	3,0 mM	1,5
d’NTPs	1,25 Mm	100µM	2,0
Primer	4µM	0,4 µM	2,5
Taq DNA Polimerase	5 U/µL	1,5 U	0,3
DNA		50 ng	5,0
Total			25,0

FONTE: O autor

A análise da variabilidade genética foi realizada agrupando as linhagens segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Foi utilizado o coeficiente de similaridade Jaccard, que permitiu calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de banda), segundo a fórmula $J = M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis (bandas) menos o número de concordâncias negativas. As unidades (linhagens) foram agrupadas por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), modelo de agrupamento hierárquico que permite a construção de dendrogramas (SNEATH; SOKAL, 1973).

As matrizes e os dendrogramas foram elaborados com auxílio do programa NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy System of Multivariate*) (ROHLF, 1988). A partir do dendrograma foi gerada uma matriz cofenética que foi comparada pelo teste de correlação de matrizes de Mantel, com a matriz de similaridade inicialmente obtida com os marcadores RAPD. A confiabilidade dos agrupamentos dos dendrogramas foi testada por meio de análise *bootstrap* com 10000 reamostragens, segundo Felsenstein (1985), utilizando o *software* Bood v3.04 (COELHO, 2005). Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 70%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap*.

4.4.8. PCR

Para as reações de PCR foram utilizados os pares de *primers* específicos para as espécies *C. gloeosporioides* (CgInt), *C. acutatum* (CaInt2), conforme metodologia descrita por Afanador-kafuri et al. (2003). Foram utilizadas linhagens referência de *C. gloeosporioides* (C91), *C. boninense* (C25) e de *Colletotrichum* sp (MA76) como controle positivo.

4.4.9 RNA Dupla Fita

Após a extração do DNA genômico foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% para observar a ocorrência de bandas de RNA dupla fita. Para confirmação, o DNA dos isolados foi submetido separadamente aos tratamentos de digestão enzimáticas com RNase, DNase e Nuclease S1.

4.4.9.1 Tratamento com RNase

Para cada 20 µl de DNA extraído e ressuspenso em água ultrapura foi adicionado 0,5 µl da enzima RNase. Incubou-se durante 1 hora a 37°C. Em seguida foi adicionado um volume de clorofil e centrifugado durante 15 minutos a 5000 rpm. A fase aquosa foi coletada e adicionada a esta 10% do volume total de acetato de sódio. Centrifugou-se 20 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e lavado com 50 µl de etanol 70% e centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente. Descartou-se novamente o sobrenadante e secou-se a 37°C durante 30 minutos. Adicionou-se 20 µl de água ultrapura.

4.4.9.2 Tratamento com Nuclease S1

Para cada 20 µl de DNA extraído e ressuspenso em água ultrapura foi adicionado 2,5 µl do tampão de diluição 10x, 0,5 µl da enzima nuclease S1 e água ultrapura suficiente para completar o volume total de 25 µl. Incubou-se durante 2 horas a 37°C. Em seguida foi adicionado um volume de isopropanol. A solução foi incubada até o dia seguinte a temperatura de -20°C. Após este período foi centrifugada durante 15 minutos a 13000 rpm. O “*pellet*” foi lavado com 250 µl de etanol 70% e centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente. Adicionou-se 20 µl de água ultrapura.

4.4.9.3 Tratamento com DNase

No momento do uso para cada 1 μ g de RNA ressuspendido em TE ou água ultrapura foi adicionado 1 μ l do tampão de diluição 10x, 1 μ l da enzima DNase I e água ultrapura suficiente para completar o volume total de 10 μ l. Incubou-se durante 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 1 μ l EDTA 25 mM e incubou-se por mais 10 minutos a 65°C para inativação da enzima.

Após os tratamentos, 5 μ l de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5% e separado por eletroforese (3 V/cm). O gel foi corado por 15 minutos com solução de Brometo de Etídio, observado em transiluminador de UV e fotodocumentado. DNA de λ /Hind III foi utilizado como marcador de peso molecular.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

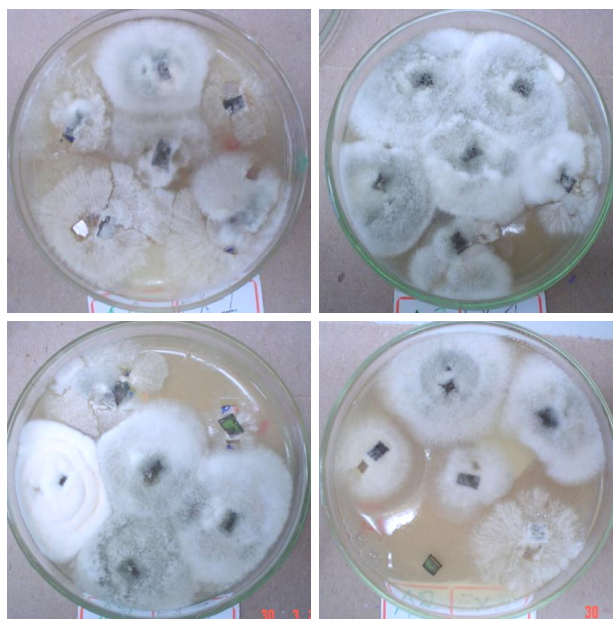
5.1. Isolamento de microrganismos endofíticos de Aroeira

Não houve recuperação de actinomicetos em nenhum dos isolamentos realizados, mesmo tendo sido utilizado meio de cultura específico. Isso se deve provavelmente a frequência desses microrganismos nas plantas serem muito baixa, ocorrendo o contrário nos solos onde a sua frequência é alta.

No primeiro isolamento foram obtidos 173 microrganismos endofíticos de folhas de aroeira resultantes de 162 fragmentos foliares plaqueados em meio BDA, NA e AC. Dos 162 fragmentos foliares plaqueados apenas 139 apresentaram crescimento variado de microrganismos em meio BDA e 19 em meio AC (TABELA 3).

Nos dois isolamentos realizados foram obtidos 301 fungos e 26 bactérias. Em alguns fragmentos foram isolados mais de um tipo de microrganismo (FIGURA 1). No primeiro isolamento (Campus UFPR) a frequência de isolamento de fungos foi de 97,5% e a de colônias bacterianas foi de 9,3% (TABELA 3). No segundo isolamento (Guaraqueçaba) a frequência de isolamento de fungos foi de 79% e a de colônias bacterianas foi de 6,8% (TABELA 4).

FIGURA 1 - ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FRAGMENTOS FOLIARES DE AROEIRA APÓS 04 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 °C EM MEIO BDA.



FONTE: O autor

TABELA 3: NÚMERO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS OBTIDOS DE FRAGMENTOS FOLIARES DE AROEIRA EM MEIO BDA, AC E AN NO ISOLAMENTO 01 NO CAMPUS CENTRO POLITÉCNICO/UFPR

MEIO DE CULTURA	NÚMERO FRAGMENTOS PLAQUEADOS	NÚMERO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	COLÔNIAS BACTÉRIANAS
BDA	54	139	0
AC	54	19	0
NA	54	0	15
Total	162	158	15

FONTE: O autor

Os fragmentos foliares apresentaram crescimento variado de microrganismos nas bordas. Destes microrganismos, 158 foram identificados como fungos filamentosos isolados nos meios de cultura BDA e AC e 15 como bactérias isoladas do meio de cultura AN.

Fazendo a identificação da macromorfologia dos fungos foi possível colocá-los em 4 grupos distintos para posterior confirmação, sendo 82 como possíveis pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, 21 ao gênero *Phomopsis*, 2 ao gênero *Pestalotiopsis* e 3 ao gênero *Phyllosticta*. Não foi possível a identificação de 50 fungos, pois os mesmos não apresentavam estruturas de reprodução.

TABELA 4: NÚMERO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS OBTIDOS DE FRAGMENTOS FOLIARES DE AROEIRA EM MEIO BDA, AC E AN NO ISOLAMENTO 02 GUARAQUEÇABA/PR

MEIO DE CULTURA	NÚMERO FRAGMENTOS PLAQUEADOS	NÚMERO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	COLÔNIAS BACTÉRIANAS
BDA	54	97	0
AC	54	27	0
NA	54	4	11
Total	162	128	11

Fonte: O autor

No isolamento 2, realizado em julho de 2007, foram isolados 139 microrganismos endofíticos de folhas de aroeira de Guaraqueçaba resultantes de 162 fragmentos foliares plaqueados em meio BDA, NA e AC (TABELA 4). Dos 139 microrganismos isolados, 128 foram identificadas como fungos filamentosos (isolados nos meios de cultura BDA e AC) e 11 colônias bacterianas (isoladas no meio de cultura NA). Por meio de características morfológicas, dos 128 fungos filamentosos isolados foi possível identificar 33 isolados como pertencentes ao gênero *Phyllosticta* e 4 como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*.

Desta forma, percebe-se que nas plantas analisadas no isolamento 1 (UFPR) houve uma porcentagem maior de fungos do gênero *Colletotrichum* (51,9%) do que *Phyllosticta* (1,9%). Entretanto, esta relação foi invertida nas plantas analisadas no isolamento 2 (Guaraqueçaba) onde isolou-se 3,1% de fungos do gênero *Colletotrichum* e 25,8% de fungos do gênero *Phyllosticta*. Por outro lado, não houve o isolamento de fungos dos gêneros *Phomopsis* e *Pestalotiopsis* como endófitos das plantas provenientes de Guaraqueçaba. Estes quatro gêneros de fungos filamentosos isolados como endófitos e identificados no presente trabalho, são os mais comumente encontrados como endófitos nas plantas investigadas (FIGUEIREDO, 2006). Segundo Pandey *et al.* (2003) e Lu *et al.* (2004), fungos dos gêneros *Phomopsis*, *Phyllosticta* e *Colletotrichum* são comumente isolados como endófitos de tecidos de diferentes espécies de plantas, em muitos casos esses fungos estão juntos num mesmo hospedeiro.

5.2 Caracterização morfológica de *Colletotrichum* spp.

Quarenta e sete isolados endofíticos que demonstraram características morfológicas semelhantes as do gênero *Colletotrichum* foram selecionados para as caracterizações morfológicas e moleculares. Os isolados foram classificados de acordo com as características descritas por Wharton e Diéguez-Uribeondo (2004) e Barreto (2004).

Os isolados apresentaram morfologia bastante variável, com diferentes tipos de crescimento micelial variando de ralo à cottonoso, micélio algumas vezes aéreo em outro compacto, diferentes cores de colônias variando de branco a cinza, muita produção de massa de conídios de cor alaranjada, no reverso, geralmente de coloração escura, percebe-se claramente a formação de setores e estruturas globulares, conídios hialinos alongados e abundantes (FIGURA 3 e 5).

As colônias apresentavam crescimento radial e rápido em meio BDA Merk, com abundante produção de micélio, variando a coloração de branco até cinza, na grande maioria podendo ocorrer a formação de setores, podendo ser devido a erros de mitoses no crescimento do fungo fora de seu hospedeiro natural (FIGURA 2a). Em algumas colônias observou-se a formação de massas de conídios de cor alaranjada, estrutura essa que permite uma boa viabilidade dos esporos mesmo depois de um longo tempo de estiagem (FIGURA 2b). O reverso das placas apresentou estruturas globulares de coloração escura e aspecto rígido espalhadas sob o meio de cultura (FIGURA 2c).

Pileggi *et al.* (2008) sugerem a rápida separação das espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. boninense* por meio de cultivo em meio BDA (Merck) a 22°C durante 6 dias. Segundo estes autores, os isolados pertencentes à espécie *C. gloeosporioides* cresce mais rapidamente (7 mm em 6 dias) do que isolados de *C. boninense* (5 mm em 6 dias). Foram feitas medições do diâmetro da colônia de 46 isolados (TABELA 5). A Figura 4 apresenta as médias de 6 repetições após 6 dias de crescimento.

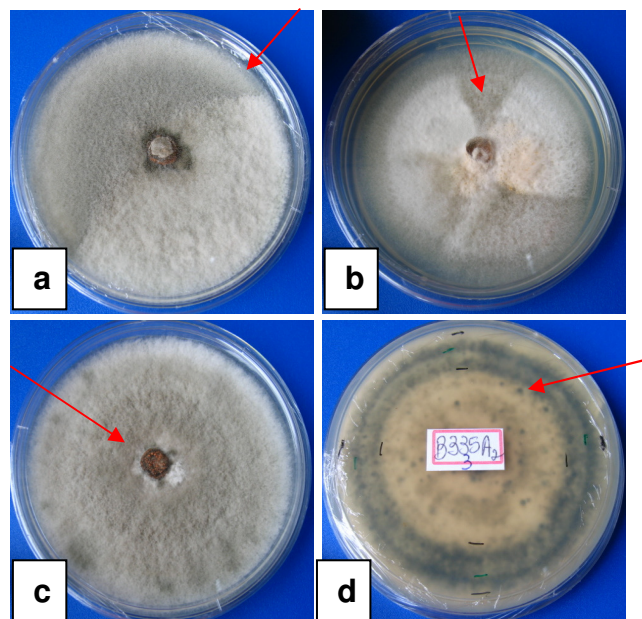


FIGURA 2 - ASPECTO MACROSCÓPICO DAS COLÔNIAS DE *Colletotrichum* sp, ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE AROEIRA
FONTE: O autor

Nota: Setas indicam em: a e b) Formação de setores; b) Massas de conídios com mucilagem cor de laranja; c) Estruturas globulares

CRESCIMENTO RADIAL

ESTRUTURAS GLOBULARES

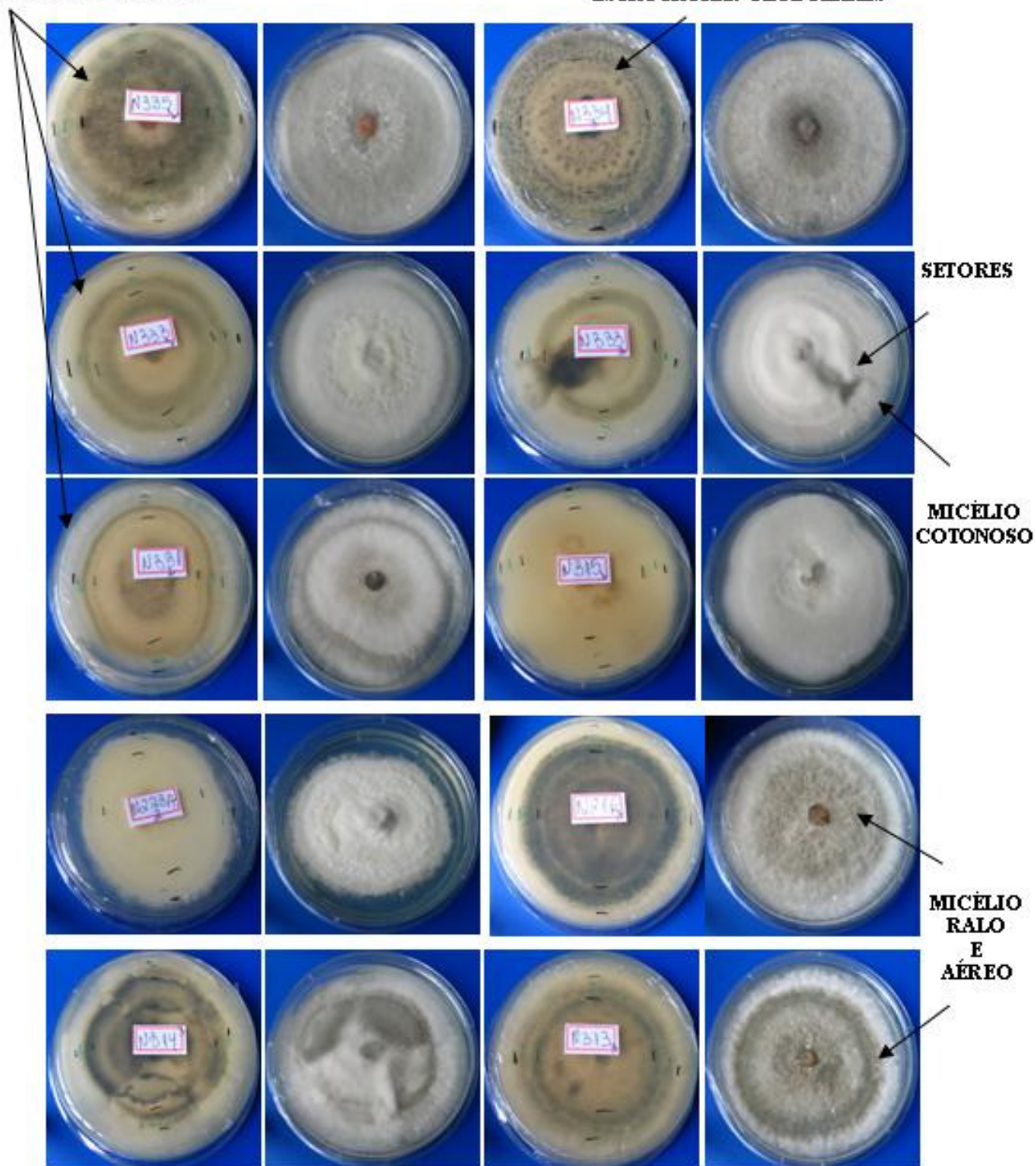


FIGURA 3 - MACRO-MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum* spp. EM MEIO BDA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22 °C

Observando-se a Figura 4 e Tabela 6, pode-se perceber que os 46 isolados de *Colletotrichum* spp possuem diâmetro da colônia variando de 4,47 a 7,8 cm após 6 dias de crescimento nestas condições. Na Figura 4, a linha vermelha indica o limite encontrado por Pileggi *et al.* (2008) que separa as espécies *C. gloeosporioides* e *C. boninense*. Percebe-se que no presente trabalho os isolados apresentaram crescimento inferior, uma vez que Pileggi *et al.* (2008) relataram diâmetros das colônias de *C. boninense* variando entre 5,1 e 6,4 cm, enquanto para *C. gloeosporioides* os valores variaram entre 7,2 e 7,3 cm.

A ANOVA revelou que há diferença significativa entre os isolados, sendo que os resultados do teste Tukey estão representados na Figura 4, sendo que a linha amarela representa o valor limítrofe observado neste trabalho. Levando em conta a formação de 3 subgrupos (I) acima de 6.5 mm; II) entre 5,3 e 6,5 cm; III) abaixo de 5,3 cm) quanto ao crescimento micelial, é possível dividir os isolados como sendo 33 *C. gloeosporioides* L1, 10 *C. gloeosporioides* L2 e 3 como *Colletotrichum* sp (FIGURA 4).

Seguindo as descrições de Wharton e Diéguez-Uribeondo (2004), Moriwaki, Toyozo e Tsukiboshi (2003) e Bentes e Barreto (2004) foi realizada a observação de micro-morfologia, sendo possível a observação de conidióforos com conídios hialinos unicelulares, geralmente em forma de bastonetes (FIGURA 5). Em alguns esporos foi possível observar a existência de septos.

Foi realizada também, a mensuração dos conídios, quanto ao comprimento e a largura dos mesmos (TABELA 5). Pileggi *et al.* (2008) relataram ser possível a separação das espécies, utilizando o comprimento do conídio, sendo identificados como *C. gloeosporioides* os isolados que possuíam comprimento superior a 7µm. Os dados da Tabela 5 mostram que para este

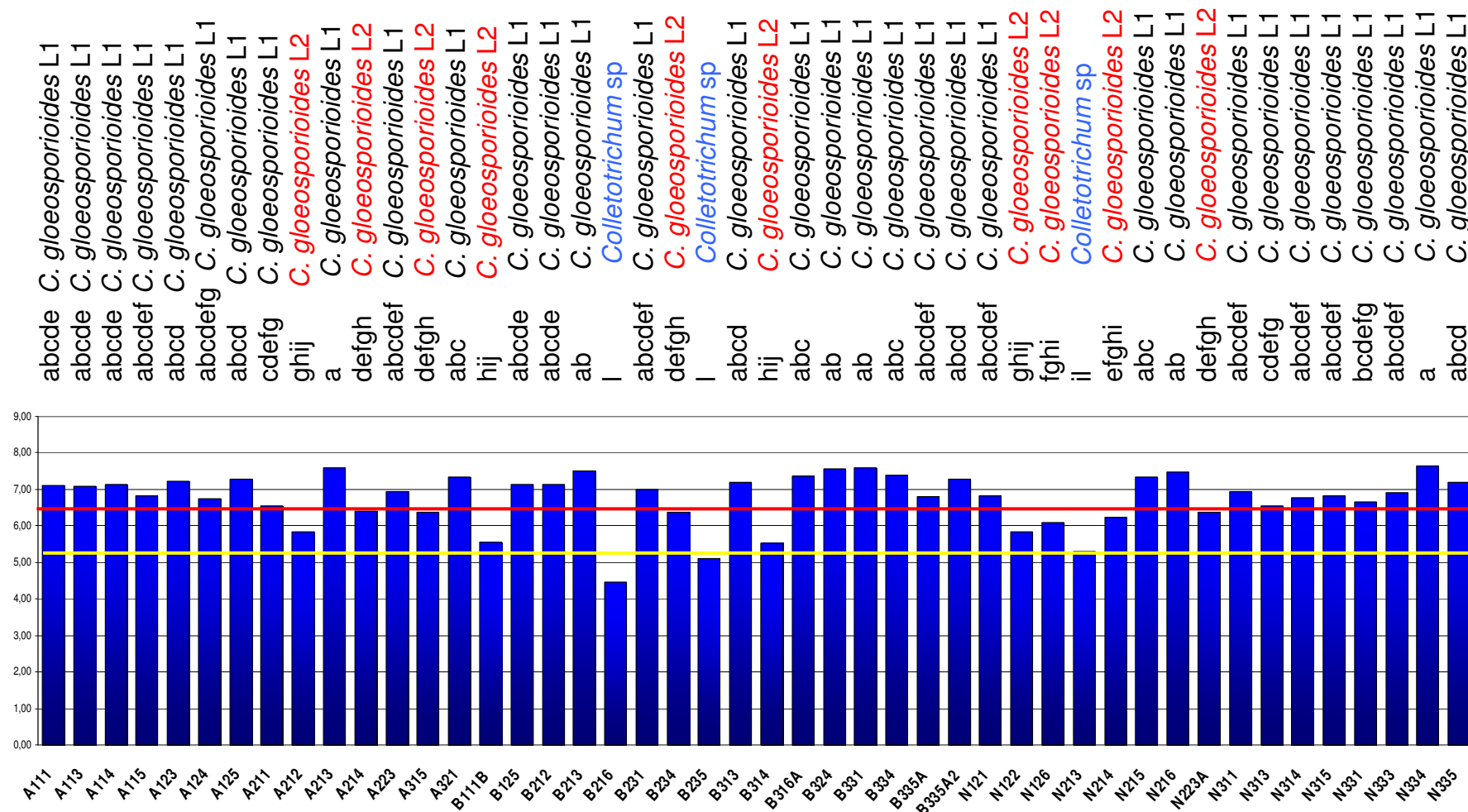


FIGURA 4: MÉDIA DE CRESCIMENTO MICELIAL DE 46 ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA (MERCK) A 22 °C

Fonte: O autor. Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Linha vermelha: Valor limítrofe encontrado por Pileggi *et al.* (2008) ↑ *C. gloeosporioides*, ↓ *C. boninense*; Linha amarela: Valor limítrofe encontrado no presente trabalho.

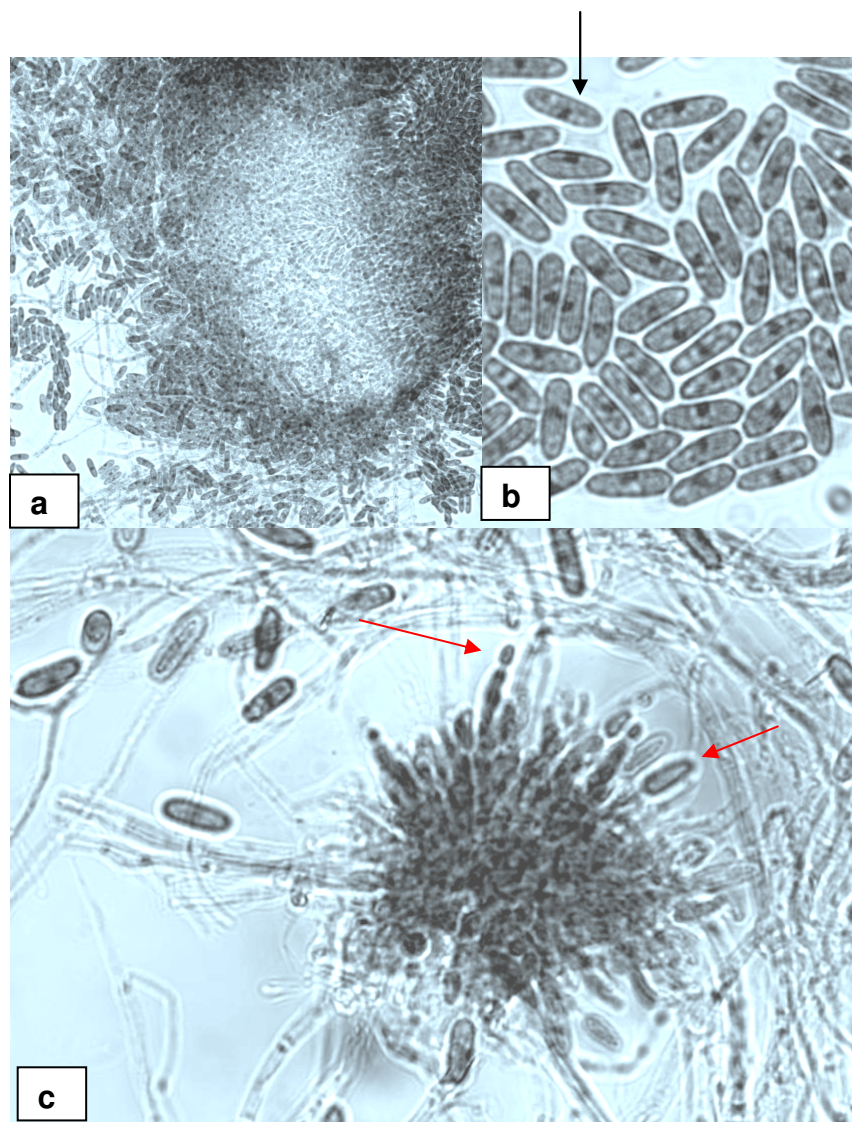


FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum* spp. EM MEIO BDA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C

FONTE: O autor

Nota: a e b) Setas pretas indicam os conídios. c) Conidióforo com conídios em formação (setas vermelhas). Aumento 1000x.

TABELA 5: COMPRIMENTO E LARGURA DOS CONÍDIOS DE 28 ISOLADOS DE *Colletotrichum spp* APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA A 22 °C

ISOLADOS	IDENTIFICAÇÃO POR CRESCIMENTO MICELIAL	COMPRIMENTO CONIDIO μM	TESTE TUKEY	LARGURA CONIDIO μM	TESTE TUKEY
B316A	<i>C. gloeosporioides</i> L1	17,1	a ¹	6,9	ab
A321	<i>C. gloeosporioides</i> L1	16,1	ab	6,9	a
B313	<i>C. gloeosporioides</i> L1	15,6	bc	6,2	abcd
A223	<i>C. gloeosporioides</i> L1	15,6	bc	6,1	abcde
B213	<i>C. gloeosporioides</i> L1	15,5	bcd	6,4	abc
N335	<i>C. gloeosporioides</i> L1	15	bcde	5,7	abcdefg
N216	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,8	bcde	6,1	abcde
B125	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,8	bcde	5,9	abcdef
A315	<i>C. gloeosporioides</i> L2	14,6	bcdef	6,4	abc
A111	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,5	cdef	5,7	bcdefgh
N215	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,4	cdef	5,4	bcdefghij
N311	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,4	cdef	5,4	cdefghij
N313	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,2	cdefg	4,2	ghij
A123	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,1	efg	5,7	bcdefghi
A214	<i>C. gloeosporioides</i> L2	14,1	defg	5,2	cdefghij
A114	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14	efg	5,2	cdefghij
B324	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,6	efgh	5,2	cdefghij
B335A	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,6	efgh	4,8	defghij
A124	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,6	efgh	5	cdefghij
A213	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,2	fghi	4,2	hij
A115	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,2	hil	4	j
B314	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,2	fghij	5,4	bcdefghij
N334	<i>C. gloeosporioides</i> L1	12,7	ghij	5,6	abcdefghi
B334	<i>C. gloeosporioides</i> L1	12,2	hil	5,5	abcdefghij
A211	<i>C. gloeosporioides</i> L1	12	il	5,3	cdefghij
N331	<i>C. gloeosporioides</i> L1	11,8	il	4,2	ij
N314	<i>C. gloeosporioides</i> L1	11,7	l	4,6	efghij
N213	<i>Colletotrichum sp</i>	11,2	l	4,5	fghij

Nota: ¹ As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

parâmetro não foi possível estabelecer uma associação com o crescimento radial das colônias.

5.3. Caracterização molecular de *Colletotrichum spp.*

A variabilidade genética dos 47 isolados endofíticos de *Colletotrichum spp.* foi avaliada por meio de marcadores moleculares RAPD. Segundo Glienke (1995) e Williams *et al.* (1990) é importante ensaiar diferentes concentrações de DNA e de cloreto de magnésio. Para os ensaios da caracterização molecular foram

selecionados oito *primers* (Operon Technologies[®]) que originaram bandas em maior quantidade e de melhor qualidade nas reações de PCR. O conjunto de *primers* escolhidos permitiu a amplificação de 70 bandas (FIGURA 6).

A análise das bandas pelo software NTSYS (coeficiente Jaccard) permitiu a construção de um dendrograma de similaridade genética (FIGURA 7). O coeficiente de correlação das matrizes de similaridade genética e cofenética, obtidos pelo teste de Mantel, foi elevado ($r=0,95$), indicando que o dendrograma representa de forma adequada a matriz de similaridade genética obtida pelos marcadores RAPD (FIGURA 7). Entretanto, os valores de *bootstraps* foram muito baixos dando suporte a poucos grupos de isolados. Foi então realizada uma análise de componentes principais (FIGURAS 8 e 9). Na Figura 8 é possível observar a formação de 10 grupos, que foram sugeridos com base nos resultados das Figuras 7 e 9, juntamente com os dados morfológicos descritos anteriormente. Todos estes dados estão sumarizados na Tabela 6.

Analisando a Tabela 7 verifica-se que há grande variabilidade genética e morfológica entre os isolados de *Colletotrichum* sp, entretanto, não há estruturação entre a distribuição de grupos sugerida pelos marcadores RAPD (FIGURA 8) e os grupos formados pelas características morfológicas (TABELA 6). No entanto, é possível verificar que há a tendência em os isolados do grupo I do RAPD, apresentarem crescimento mais rápido em meio de cultura, com única exceção o isolado N214, que cresceu mais lentamente, sendo classificado como *C. gloeosporioides* L2 (TABELA 6).

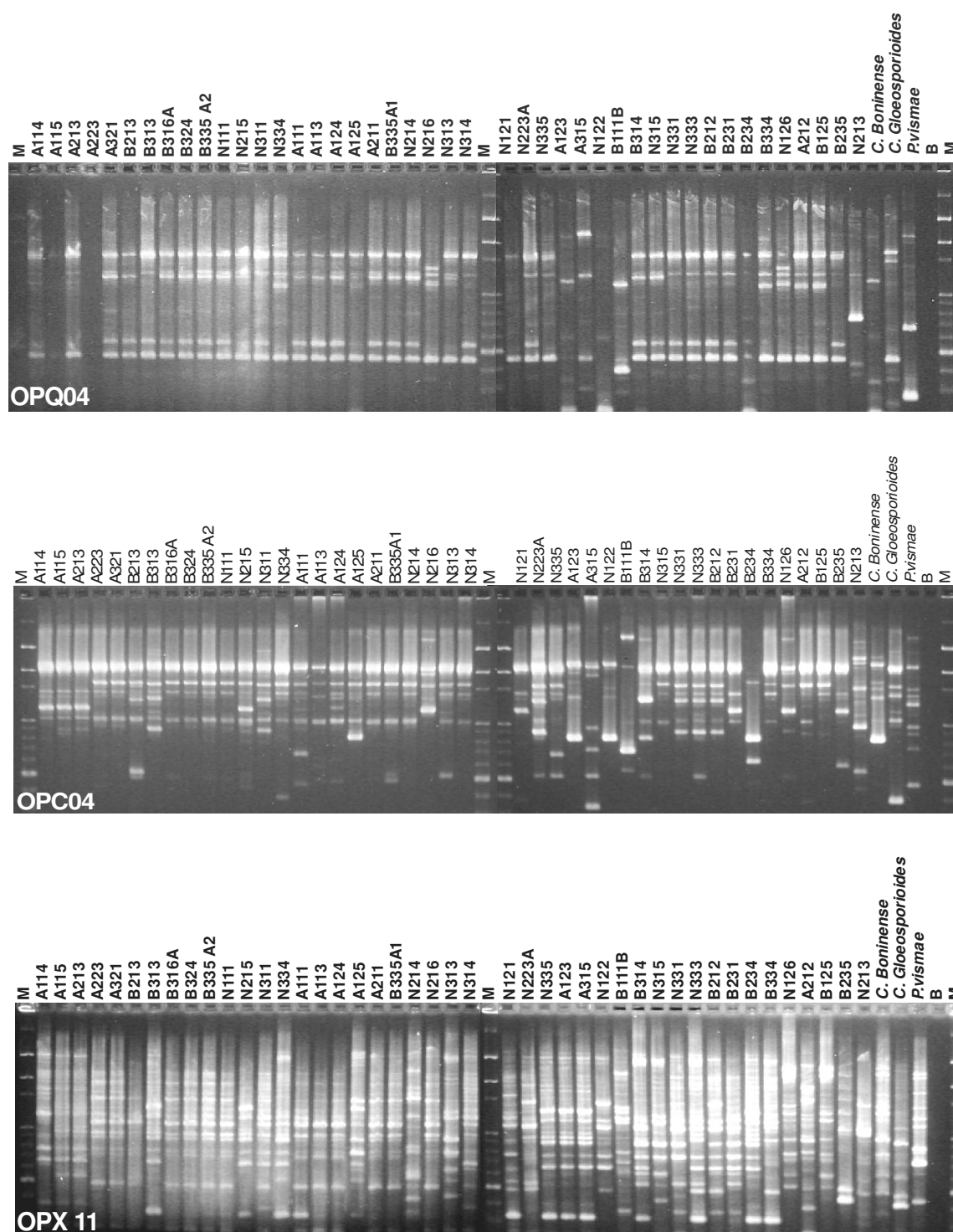


FIGURA 6: PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS ENDÓFITOS DE *Colletotrichum* spp (CONTINUA....)

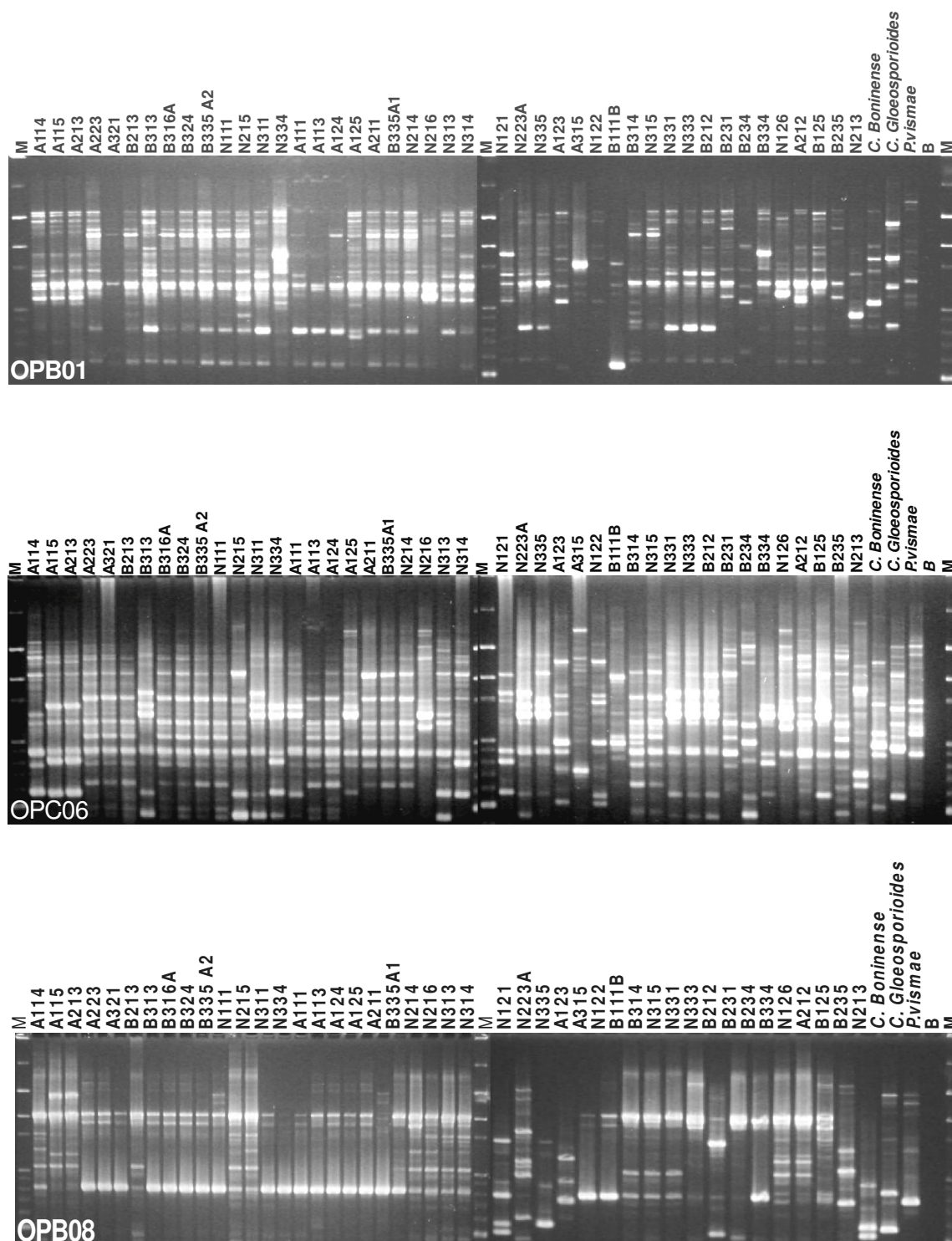
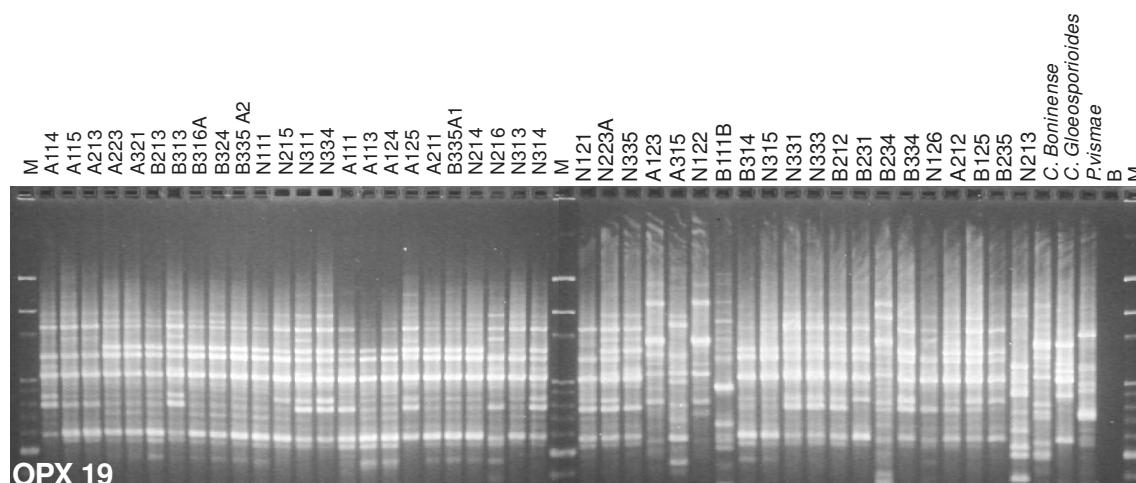
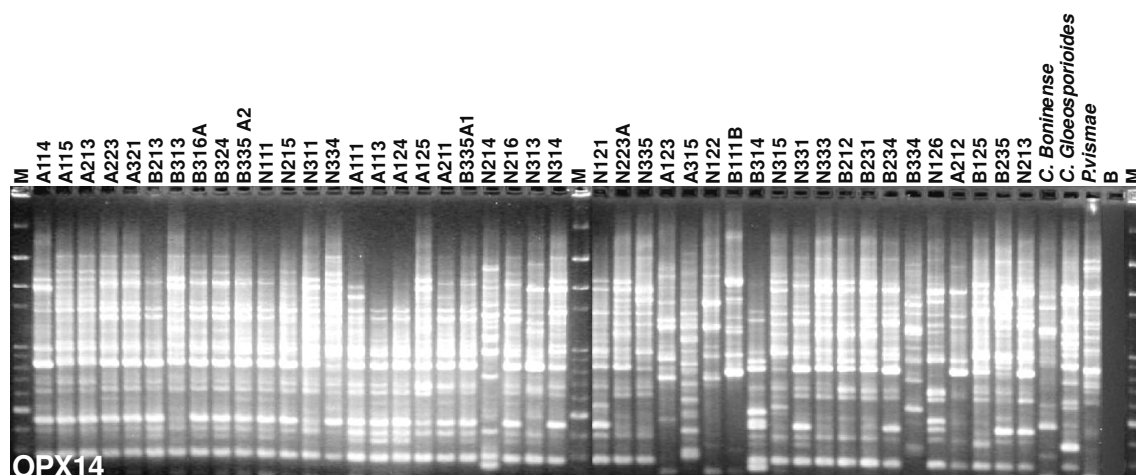


FIGURA 6: PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum* spp (CONTINUAÇÃO)



FONTE: O autor

M: Marcador de Peso Molecular *ladder* de 100 pb; **B:** Branco (controle sem DNA).

FIGURA 6: PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum* spp (CONTINUAÇÃO)

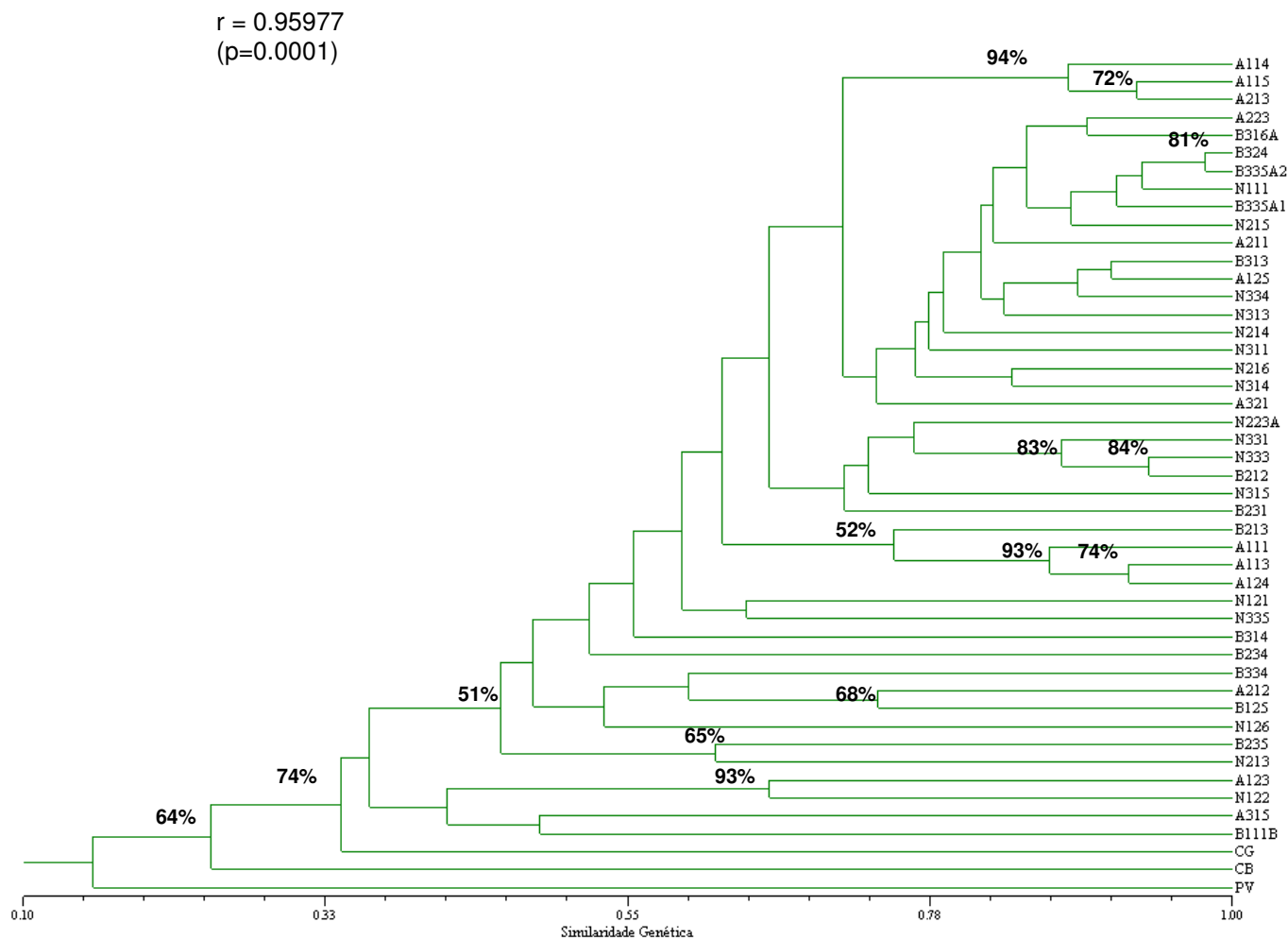


FIGURA 7 -DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum* spp. POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

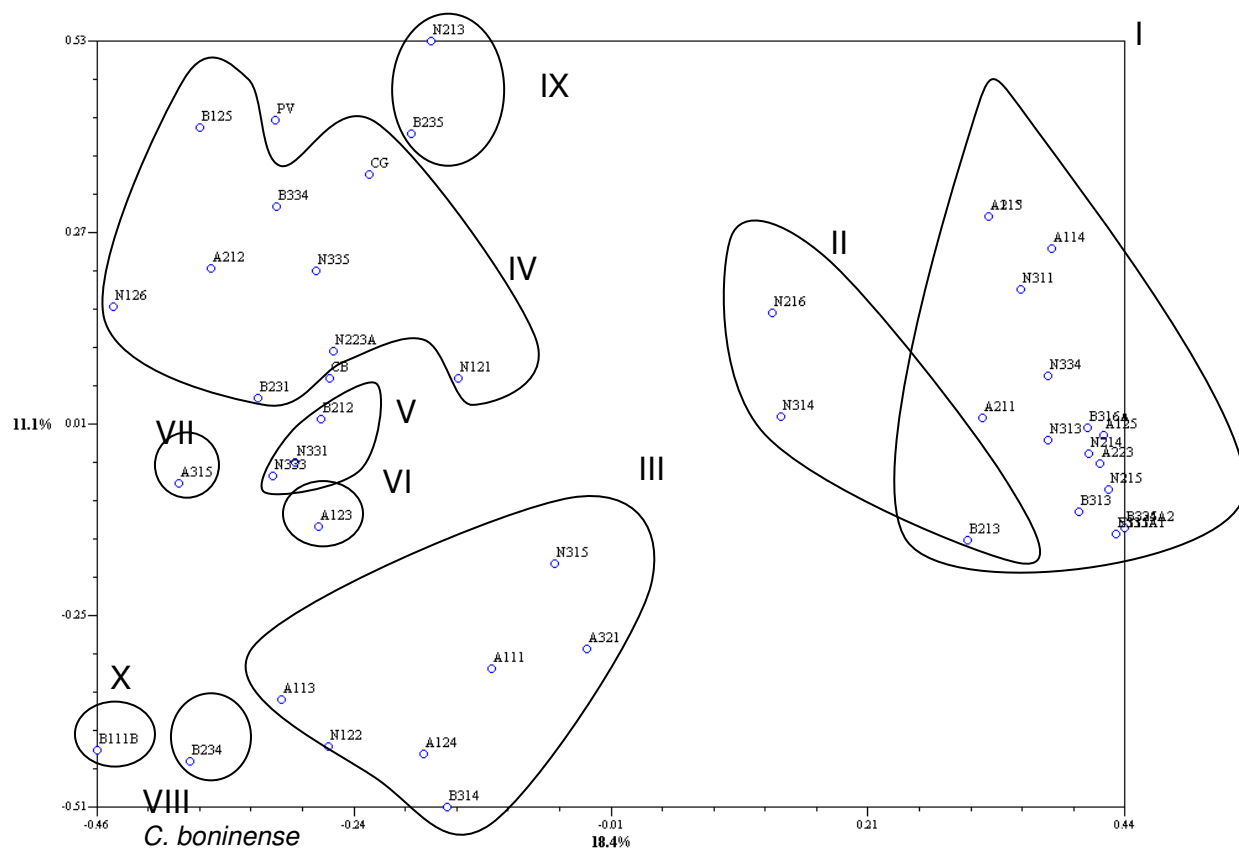


FIGURA 8 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (BIDIMENSIONAL) DE SIMILARIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS *Colletotrichum* spp UTILIZANDO OS MARCADORES RAPD

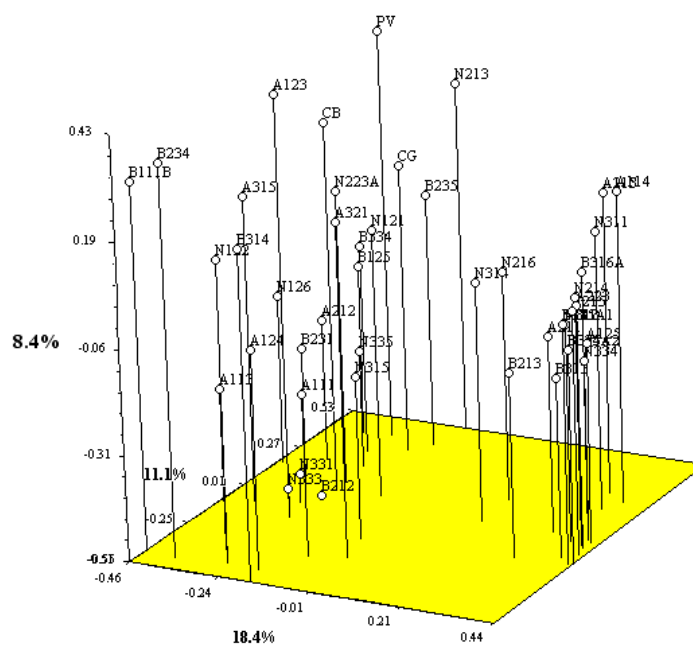


FIGURA 9 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (TRIDIMENSIONAL) DE SIMILARIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS *Colletotrichum* spp UTILIZANDO OS MARCADORES RAPD

TABELA 6: RESULTADOS GERAIS DAS CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum* spp.

ISOLADOS	CRESCIMENTO MICELIAL MM	IDENTIFICAÇÃO POR CRESCIMENTO	COMPRIMENTO CONIDIO μM	TUKEY	LARGURA CONIDIO μM	TUKEY	RAPD	PCR
A111	71,0	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,5	cdef	5,7	abcdefgh	III	<i>C. gloeosporioides</i>
N111	N/D		N/D		N/D		I	<i>C. gloeosporioides</i>
N334	76,5	<i>C. gloeosporioides</i> L1	12,7	ghij	5,6	abcdefghi	I	<i>C. gloeosporioides</i>
A213	76,0	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,2	fghi	4,2	hij	I	<i>C. gloeosporioides</i>
B331	75,8	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		N/D	N/D
B324	75,5	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,6	efgh	5,2	cdefghij	I	<i>C. gloeosporioides</i>
B213	75,0	<i>C. gloeosporioides</i> L1	15,5	bcd	6,4	abc	I/II	<i>C. gloeosporioides</i>
N216	74,7	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,8	bcde	6,1	abcde	II	<i>C. gloeosporioides</i>
B334	74,0	<i>C. gloeosporioides</i> L1	12,2	hil	5,5	abcdefghij	IV	<i>C. gloeosporioides</i>
B316A	73,5	<i>C. gloeosporioides</i> L1	17,1	a	6,9	ab	I	<i>C. gloeosporioides</i>
A321	73,3	<i>C. gloeosporioides</i> L1	16,1	ab	6,9	a	III	<i>C. gloeosporioides</i>
N215	73,3	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,4	cdef	5,4	bcdefghij	I	<i>C. gloeosporioides</i>
A125	72,8	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		I	<i>C. gloeosporioides</i>
B335A2	72,8	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		I	<i>C. gloeosporioides</i>
A123	72,2	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,1	efg	5,7	abcdefghi	VI	?
B313	72,0	<i>C. gloeosporioides</i> L1	15,6	bc	6,2	abcd	I	<i>C. gloeosporioides</i>
N335	71,8	<i>C. gloeosporioides</i> L1	15	bcde	5,7	abcdefg	IV	<i>C. gloeosporioides</i>
A114	71,5	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14	efg	5,2	cdefghij	I	<i>C. gloeosporioides</i>
B125	71,5	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,8	bcde	5,9	abcdef	IV	<i>C. gloeosporioides</i>
B212	71,5	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		V	<i>C. gloeosporioides</i>
A113	70,8	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		III	<i>C. gloeosporioides</i>
B231	69,8	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		IV	<i>C. gloeosporioides</i>
A223	69,5	<i>C. gloeosporioides</i> L1	15,6	bc	6,1	abcde	I	<i>C. gloeosporioides</i>
N311	69,5	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,4	cdef	5,4	cdefghij	I	<i>C. gloeosporioides</i>
N333	69,0	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		V	<i>C. gloeosporioides</i>

N315	68,3	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		III	<i>C. gloeosporioides</i>
A115	68,2	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,2	hil	4	j	I	<i>C. gloeosporioides</i>
N121	68,2	<i>C. gloeosporioides</i> L1	N/D		N/D		IV	<i>C. gloeosporioides</i>
B335A	68,0	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,6	efgh	4,8	defghij	I	<i>C. gloeosporioides</i>
N314	67,8	<i>C. gloeosporioides</i> L1	11,7	I	4,6	efghij	II	<i>C. gloeosporioides</i>
A124	67,3	<i>C. gloeosporioides</i> L1	13,6	efgh	5	cdefghij	III	<i>C. gloeosporioides</i>
N331	66,7	<i>C. gloeosporioides</i> L1	11,8	il	4,2	ij	V	<i>C. gloeosporioides</i>
A211	65,3	<i>C. gloeosporioides</i> L1	12	il	5,3	cdefghij	I	<i>C. gloeosporioides</i>
N313	65,3	<i>C. gloeosporioides</i> L1	14,2	cdefg	4,2	ghij	I	<i>C. gloeosporioides</i>
A214	64,0	<i>C. gloeosporioides</i> L2	14,1	defg	5,2	cdefghij	N/D	N/D
A315	63,8	<i>C. gloeosporioides</i> L2	14,6	bcdef	6,4	abc	VII	<i>Colletotrichum</i> sp
N223A	63,8	<i>C. gloeosporioides</i> L2	N/D		N/D		IV	<i>C. gloeosporioides</i>
B234	63,7	<i>C. gloeosporioides</i> L2	N/D		N/D		VIII	<i>C. boninense</i>
N214	62,3	<i>C. gloeosporioides</i> L2	N/D		N/D		I	<i>C. gloeosporioides</i>
N126	60,8	<i>C. gloeosporioides</i> L2	N/D		N/D		IV	<i>C. gloeosporioides</i>
A212	58,5	<i>C. gloeosporioides</i> L2	N/D		N/D		IV	<i>C. gloeosporioides</i>
N122	58,3	<i>C. gloeosporioides</i> L2	N/D		N/D		III	N/D
B111B	55,7	<i>C. gloeosporioides</i> L2	N/D		N/D		X	<i>Colletotrichum</i> sp
B314	55,2	<i>C. gloeosporioides</i> L2	13,2	fghij	5,4	bcdefghij	III	<i>C. gloeosporioides</i>
N213	53,2	<i>Colletotrichum</i> sp	11,2	I	4,5	fghij	IX	<i>Colletotrichum</i> sp
B235	51,2	<i>Colletotrichum</i> sp	N/D		N/D		IX	<i>Colletotrichum</i> sp
B216	44,7	<i>Colletotrichum</i> sp	N/D		N/D		N/D	N/D

5.4. Identificação por PCR espécie específica

Foi realizada reação de PCR com 43 isolados de *Colletotrichum* spp, utilizando dois pares de *primers*, um para *C. gloeosporioides* (CgInt) e outro para *Colletotrichum* sp (Col1) desenvolvidos por Afanador-Kafuri *et al.* (2003). No mesmo ano Moriwaki, Toyozo e Tsukiboshi (2003) propuseram a classificação de isolados inicialmente identificados como *C. gloeosporioides* como pertencentes a uma nova espécie, que denominaram de *C. boninense*. Pileggi *et al.* (2008) sugeriram que o par de *primers* desenvolvido por Afanador-Kafuri *et al.* (2003) para *Colletotrichum* sp amplificam isolados da nova espécie *C. boninense* proposta por Moriwaki, Sato e Tsukiboshi (2003). Uma vez que Pileggi *et al.* (2008) trabalharam com apenas 15 isolados de *Colletotrichum*, os resultados obtidos no presente trabalho visam corroborar tais achados.

Na Figura 10 estão os géis de eletroforese com as amplificações com o *primer* CgInt específico para a espécie *C. gloeosporioides*. Pode-se observar que apenas 5 isolados endofíticos (A315, B111B, N213, B234 e B235) não amplificaram a banda esperada de aproximadamente 600pb. Na Figura 11 estão os géis de eletroforese com as amplificações com o *primer* Col1, desenvolvidos para *Colletotrichum* sp e que segundo Pileggi *et al.* (2008), amplificam uma banda específica para *C. boninense*. Observa-se que apenas 2 isolados endofíticos (B234 e A123) amplificaram a banda de aproximadamente 600pb. Nestas amplificações foram utilizados com sucesso linhagens referência para *C. gloeosporioides* (C91), *C. boninense* (C25) e um isolado de *Colletotrichum* sp (76) para o qual o *primer* Col1 foi desenhado (AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003). Os resultados estão sumarizados na Tabela 6. Percebe-se que o isolado A123 amplificou com ambos *primers*, o que dificulta a sua identificação. Em outra repetição tal isolado amplificou apenas com o *primer* Col1, entretanto, os dados morfológicos o agrupam com isolados de *C. gloeosporioides* (FIGURA 4 e TABELA 6). Por outro lado, marcadores RAPD foram insuficientes para identificá-lo e foi denominado de grupo VI (FIGURA 8 e TABELA 6).

Por outro lado, o isolado B234 amplificou apenas com o *primer* Col1, apresentou diferente perfil de bandas no RAPD (denominado de grupo VIII) mas apresentou crescimento intermediário (FIGURA 8 e TABELA 6). Entretanto, em função dos resultados obtidos com marcadores moleculares (RAPD e PCR), sugere-se que tal isolado seja identificado como *C. boninense*. Os isolados A315, B111B,

N213 e B235 não apresentaram amplificação com nenhum dos *primers* espécie específicos. Tais isolados também apresentaram perfil de RAPD diferente dos demais e foram denominados de grupos VII (A315), IX (N213 e B235) e X (B111B) conforme mostra a FIGURA 8. Os isolados N213 e B235 também apresentaram crescimento reduzido e foram denominados de *Colletotrichum* sp. É possível que tais isolados pertençam à espécie *C. acutatum* também comumente encontrados como endófitos. Para tanto, sugere-se que seja realizada amplificação com *primers* específicos para tais espécies (AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003). Os isolados A315 e B111B apresentaram crescimento radial intermediário, compatíveis com *C. gloeosporioides* L2. Sugere-se que novas reações de PCR espécie específica e sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA seja realizada a fim de elucidar a identificação destes isolados.

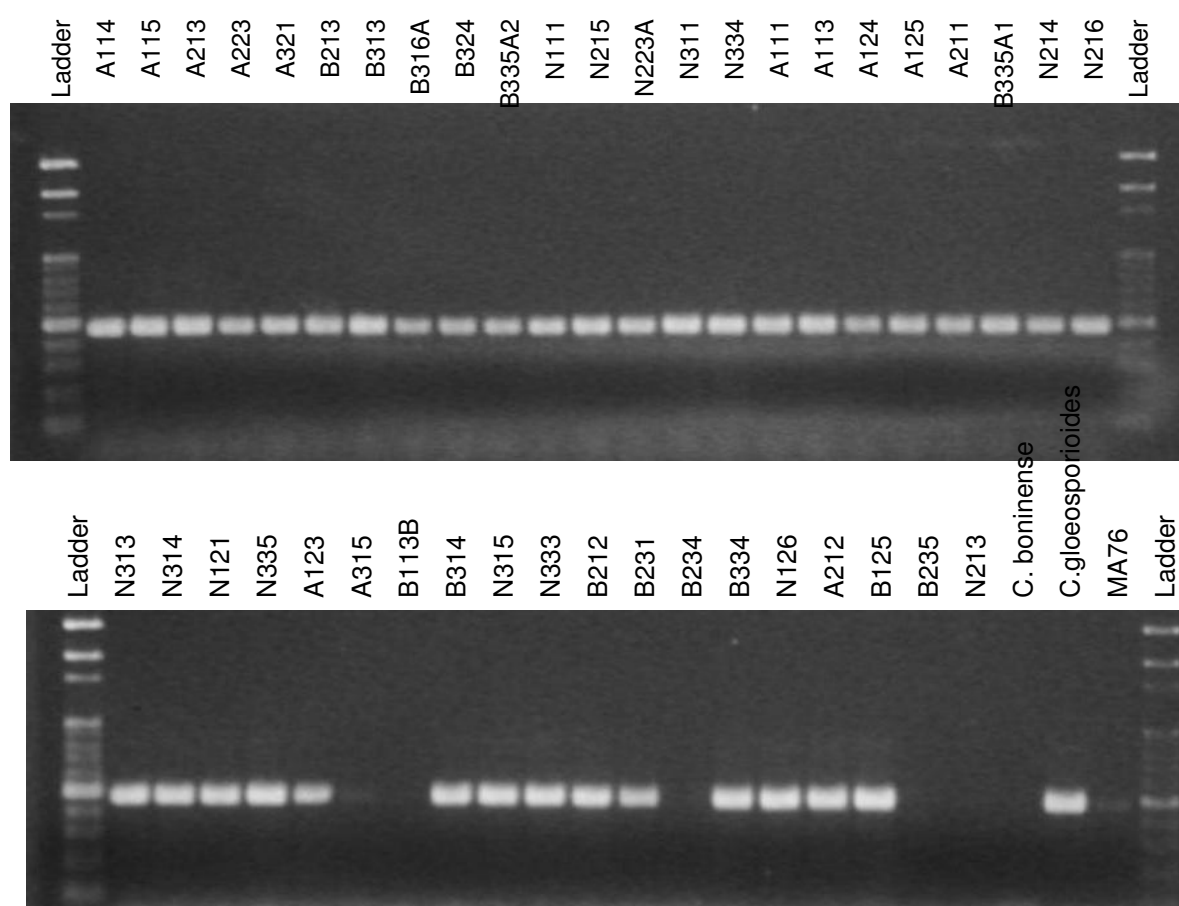


FIGURA 10: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM AS REAÇÕES DE PCR DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* SPP UTILIZANDO O PRIMER CGINT ESPECÍFICO PARA *C. gloeosporioides*

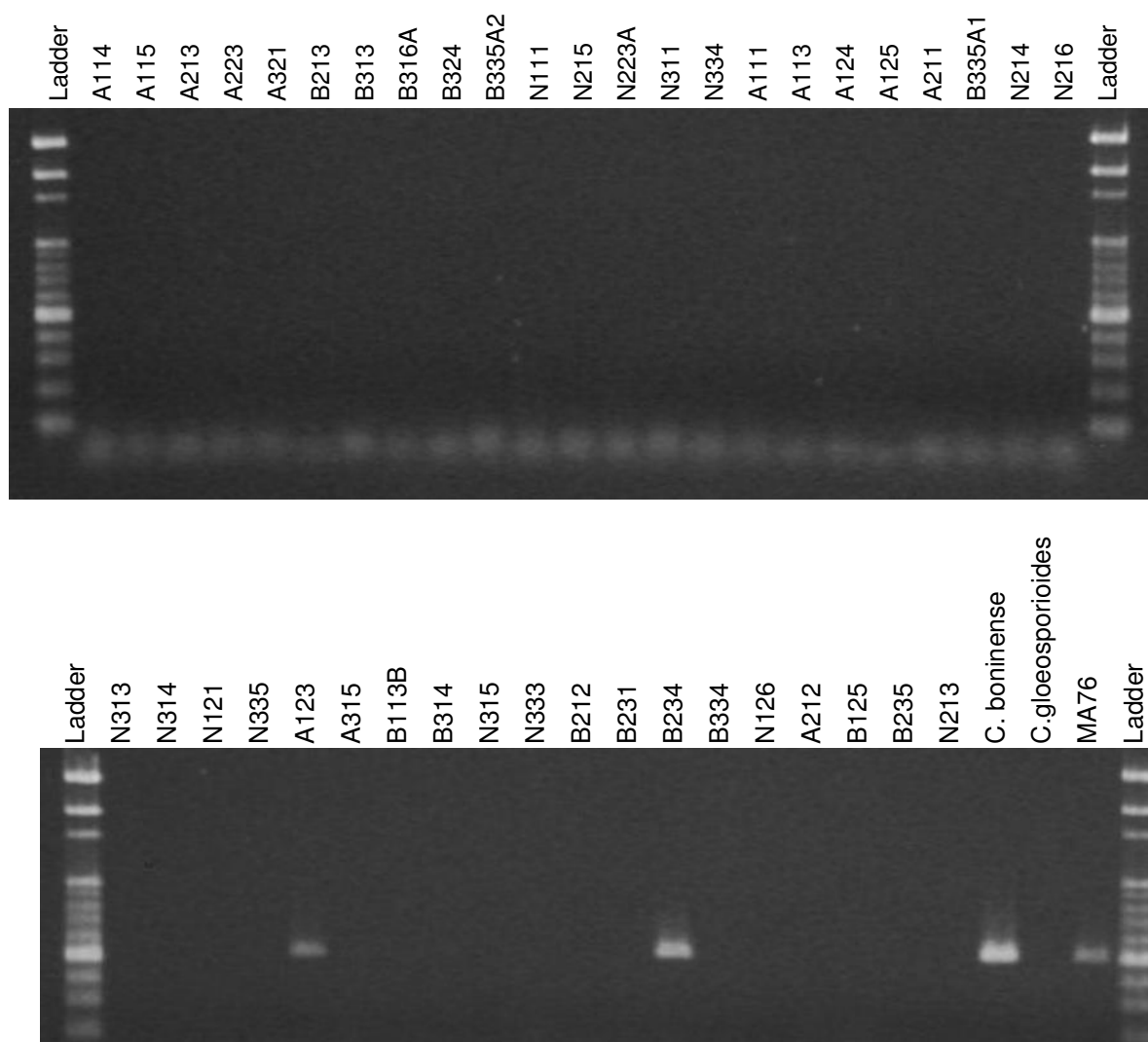


FIGURA 11: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM AS REAÇÕES DE PCR DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* SPP UTILIZANDO O PRIMER COL 1 ESPECÍFICO PARA *Colletotrichum* sp

5.5 RNA Dupla Fita

A partir da eletroforese em gel de agarose do DNA genômico obtido, foi possível visualizar a presença de bandas com aproximadamente 3000 pb indicando a presença de RNA dupla-fita (RNA_{df}) nas linhagens A212, A223, A321, B213, N121, N223A e N335 (FIGURA 12). A fim de confirmar que tais bandas correspondem a RNA_{df}, foi realizado tratamento dos ácidos nucléicos totais separadamente com as enzimas DNase, nuclease S1 e RNase e uma nova corrida eletroforética foi realizada (FIGURA 13). Foi possível visualizar a presença das bandas e confirmar a identificação como RNA_{df} nos isolados A212, A321 e B213. Entretanto nos isolados A212 e A321 não ocorreu total eliminação do RNA durante o tratamento com RNase (FIGURA 13). Uma vez que também não houve a completa eliminação do RNA_m no presente tratamento, não pode-se descartar que a banda de aproximadamente 3.000 pb corresponda a RNA_{df}.

Não é possível fazer qualquer associação da presença destas bandas de RNA_{df} com grupos geneticamente diferentes (FIGURA 8) no RAPD.

Banda de RNA_{df} de mesmo peso molecular foi observada por Kava-Cordeiro (2004) e Silva (2008) para o fungo *G. citricarpa*. Kava-Cordeiro (2004) por meio de microscopia eletrônica de transmissão sugeriu que tal RNA_{df} possa corresponder a partículas virais da família Totiviridae. A presença RNA_{df} é descrita em fungos entomopatogênicos há muito tempo (MELZER; BIDOCHKA, 1998; HOWITT *et al.* 1995; CASTRO *et al.* 1999; PREISIG *et al.* 2000; PAPP *et al.* 2001; ROBINSON; DEACON, 2002).

Dalzoto *et al.* (2006) descreveram a transferência horizontal e hipovirulência associada com RNA_{df} de *Beauveria bassiana*. Os autores também sugerem o aumento da produção de conídios nas linhagens tratadas sem o RNA_{df}, quando comparado com as linhagens que apresentavam RNA_{df}.

Os fungos *B. cinerea* (HOWITT *et al.* 1995), *E. festucae* (ZABALGOGEAZCOA *et al.* 1998), *Aspergillus* spp. (VARGA *et al.*, 1994) e *Rhizopus* (PAPP *et al.* 2001) também apresentaram aumento na produção de conídios como os descritos por Dalzoto *et al.* (2006).

Mudanças morfológicas das colônias associadas com a presença RNA_{df} forma descritas em *Chalara elegans* (PUNJA, 1994), *M. anisopliae* (MELZER e

BIDOCHKA 1998; GIMENEZ-PECCI *et al.*, 2002), *D. ambigua* (PREISIG *et al.*, 2000), e *Nectria radicicola* (PYUNG & HWAN, 2001).

São poucos os trabalhos que descrevem a presença de RNAdf em fungos endofíticos. Zabalgogezcoa *et al.* (1998), verificaram a presença de RNAdf no fungo endofítico *Epichloë festucae*, obtido da planta assintomática *Festuca rubra*. Os autores não detectaram diferenças na morfologia das colônias entre isolados com RNAdf daqueles livres de RNAdf.

Em relação à morfologia, apenas o isolado A212 difere-se dos demais, sua colônia tem micélio branco e aspecto algodinoso, o crescimento é radial e o reverso é branco sem estruturas globulares de coloração escura e aspecto rígido espalhadas sob o meio de cultura. Não apresenta a formação de massas de conídios de cor alaranjada. Não foi possível a análise de microscopia, pois o mesmo não apresentou a formação de esporos.

No gênero *Colletotrichum* não é conhecida a influência que tais partículas possam causar. Sugere-se que tais partículas sejam melhores investigadas por meio de microscopia eletrônica de varredura e também pelo estudo destas linhagens após sofrerem a cura (eliminação) do RNAdf.

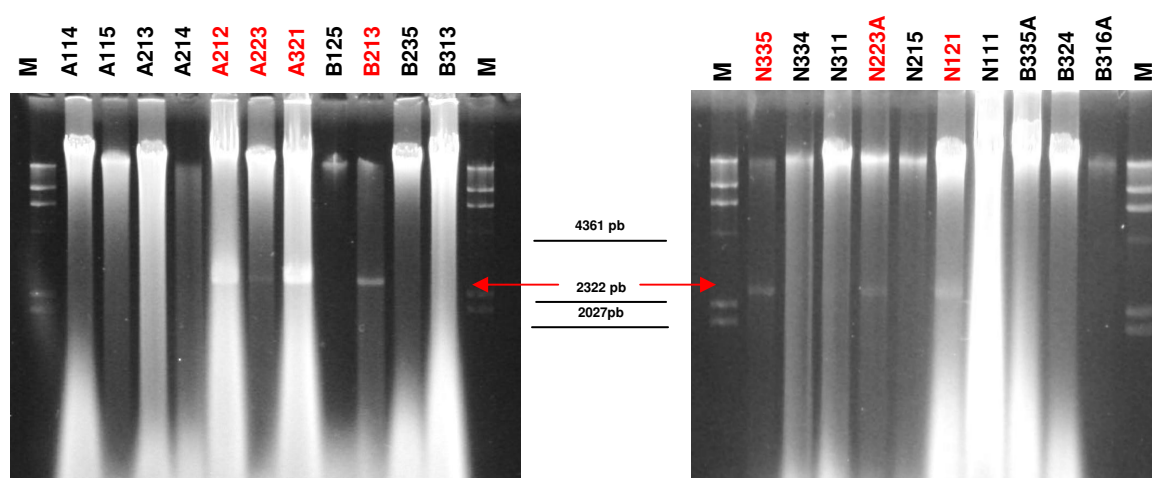


FIGURA 12 – ELETOROFESE EM GEL DE AGAROSE DOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DE 21 ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum* spp

FONTE: O autor

Nota: M: fago λ clivado com *HindIII*; Em destaque os isolados portadores de RNAdf; Setas vermelhas indicam a localização das bandas extras.

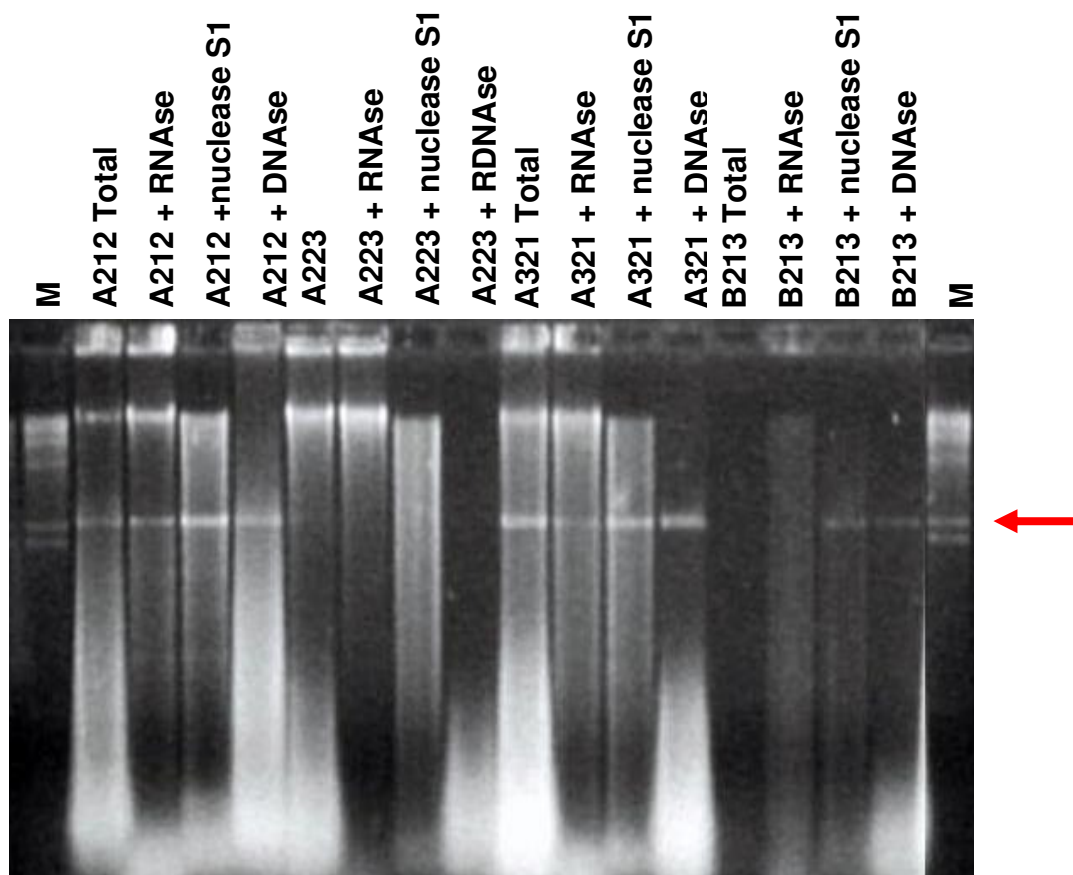


FIGURA 13 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DE 4 ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp APÓS TRATAMENTOS COM RNase, NUCLEASE S1 E DNase

FONTE: O autor

NOTA: M: fago λ clivado com *Hind*III; Seta vermelha indica a localização do RNAdf.

6.CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- As plantas de *Schinus terebinthifolius* analisadas são colonizadas por uma grande variabilidade de microrganismos endofíticos;
- Os principais gêneros endofíticos isolados nas plantas com produção de princípio ativo foram *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Phomopsis* e *Pestalotiopsis*;
- Os principais gêneros endofíticos isolados nas plantas sem produção de princípio ativo foram *Phyllosticta* e *Colletotrichum*;
- As plantas analisadas são colonizadas principalmente pela espécie *C. gloeosporioides*;
- Há grande diversidade morfológica e genética dos isolados de *C. gloeosporioides* analisados;
- As características morfológicas são importantes na identificação das espécies de *Colletotrichum*, porém são insuficientes;
- Marcadores RAPD são úteis na identificação das espécies de *Colletotrichum*, porém são insuficientes;
- Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* foram pela primeira vez descritos como hospedeiros de partículas de RNAdf sem no entanto haver associação com características morfológicas ou perfil de RAPD.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. **Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus.** *Phytopathology*, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 579-587, May. 2003.

AHN, I.P.; LEE, Y.H. **A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v. 14, p. 496-507, April, 2001.

ALEXOPOULUS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. **Introductory mycology.** John Wiley & Sons Inc., UEA. 4th ed. 831pp, 1996.

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. **Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n.5, p. 467- 470, 2005.

AMORIM, M. M. R. de; SANTOS, L. C. **Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado.** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros.** Piracicaba, São Paulo, 1996.111p. Dissertação de Mestrado, - Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.C.; AZEVEDO, J. L. **Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.).** *Brazilian Archive of Biology and technology*, v. 43, p. 447-457, 2000.

ARAÚJO, W. L. de; MACCHERONI Jr., W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. **Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks.** *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 3; p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; LIMA, A. O. S.; MARCOM, J.; SOBRAL, J. L.; LACAVA, P. T. **Manual: Isolamentos de fungos endofíticos.** Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARAYA, C. M.; ALLEYNE, A. T.; STEADMAN, J. R. **Phenotypic and genotypic characterization of *Uromyces appendiculatus* from *Phaseolus vulgaris* in the Americas.** *Plant Disease*, v. 88, p. 830-836, 2004.

ARNOLD, E. A.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. **Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree.** PNAS, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

AUGUSTIN, E.; COSTA, J.G.C. **Fontes de resistência a duas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no melhoramento do feijoeiro no Sul do Brasil.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 6:265-272, 1971.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de (Eds.). Ecologia Microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. p. 117- 137. 1998

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. **Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants.** Electronic Journal of Microbiology, v. 3, p. 40-65, 2000.

BACON, C. W.; WHITE, J. F. **Microbial endophytes.** Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. 2000.

BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control.** Oxford: British Society for Plant Pathology. 388p, 1992.

BELABID, L.; BAUM, M.; FORTAS, Z.; BOUZNAD, Z.; EUJAYL, I. **Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis.** African Journal of Biotechnology, v. 3, p. 25-31, 2004.

BENTES, J.L.S.; BARRETO, R.W. **Taxonomic reevaluation of *Colletotrichum guaranicola* Albuq. causal agent of guaraná anthracnose.** Acta Amazonica, 34: 129-131. (in Portuguese, with abstract in English), 2004.

BLANCO, C.G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro.** Piracicaba, 1999. Tese de Doutorado- escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

BOLAND, G.J. **Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*.** Canadian Journal of Plant Pathology, Guelph, v.14, p. 10-17, 1992.

BONDE, M.R.; PETERSON, G.C.; MAAS, G.L. **Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* spp. pathogenic to strawberry.** Phytopathology 81, 1523-1528, 1991.

BOROS, L.F. **Ação antimicrobiana do extrato hidroalcolico de folhas da *Schinus terebenthifolius* Raddi(Aroeira)**. Curitiba, 2007. Dissertação de mestrado-UFPR.

BUCK, K.W. **Fungal virology – An overview**. In: BUCK, K.W. ed. Fungal virology. Boca Raton : CRC, p. 1-84,1986.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; McKENZIE, E. H.; HYDE, K. D. **Endophytic fungi from *Amomum siamense***. Canadian Journal of Microbiology, v. 47, n. 10, p. 943-948, 2001.

CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T. da; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. **Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation**. Journal of Basic Microbiology, v. 45, n. 5, p. 397-402, 2005.

CAMPELLO, J. P.; MARSAIOLI, A. J.; **Phytochemistry**, 14, 2300,1975.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M. & PAOLI, A. A. S.. **Morfologia e anatomia da semente de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em desenvolvimento**. Revista Brasileira de Botânica 22(1): 91-98, 1999.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E.. **Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest**. Canadian Journal of Botany, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B.; STEVENS, D.; YAYER, D. **Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans***. Microbiology, v. 148, p. 2675-2685, 2002.

CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENAVENTE, J.; CASTILLO, A. **A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea***. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 175, p. 95-99, 1999.

CHANWAY, C. P. **Endophytes: they're not just fungi!** Canadian Journal of Botany, v. 74, p. 321-322, 1996.

CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H. LEE, Y.W.; KIM, K.H. **Doublestranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum***. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 68, p. 2529-2534, 2002.

COELHO, A.G. **Software Bood**. 2005

COOKE, D. E. L.; KENNEDY, D. M.; GUY, D.C.; RUSSELL, J.; UNCKLES, S.E.; DUNCAN, J. M. **Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA**. Mycological Research, v. 100, p. 297-303, 1996.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DALZOTO, P. R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. **RAPD analyses of recombination process in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana***. Mycological Research, v.107, p. 1069-1074, 2003.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J. Z.; KITAJIMA, E. W.; AZEVEDO, J. L. **Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana***. Mycological Research. United Kingdom, v. 110, p. 1475-1481, 2006.

DAUCH, A. L.; WATSON, A. K.; JABAJI-HARE, S. H. **Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers**. Journal of Microbiological Methods, v. 55, p. 51-64, 2003.

DAYSE, B. H.; STROBEL, G. A.; EZRA, D.; CASTILLO, U.; BAIRD, G.; HESS, W. M. ***Muscodor vitigenus*, sp. nov., an endophyte from *Paullinia***. Mycotaxon., 84, p. 39-50, 2002.

DÉLYE, C.; CORIO-COSTET, M. F. **Rapid isolation of both double-stranded RNA and PCR-suitable DNA from the obligate biotrophic phytopathogenic fungus *Uncinula necator* using a commercially available reagent**. Journal of Virological Methods, Amsterdam, v.74, p. 149-153, 1998.

DERSO, E.; WALLER, J. M. **Variation among *Colletotrichum* isolates from diseased coffee berries in Ethiopia**. Crop Protection, v. 22, p. 561-565, 2003.

ELLISTON, J.E. Hypovirulence. **Advances in Plant Pathology**, Toronto, v.1, p.1-33, 1982.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Edusc, 510p, 2004.

FELSENTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap**. International Journal of Organic Evolution, Lancaster, v.39, p.366-369, 1985.

FERNÁNDEZ, F.A.; HANLIN, R.T. **Morphological and RAPD analysis of *Diaporthe phaseolorum* from soybean**. Mycologia, v.88, p.425-440, 1996.

FIGUEIREDO, J.A.G. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase *Pestalotiopsis* spp.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. **The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.)**. New Phytologist, v. 122, p. 299-305, 1992.

FLEIG, M. **Anacardiaceae. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Boletim do Instituto de Biociências, v. 18, n. 42, p. 1-72.1987.

FRAZZON, A.P.G.; VAZ JUNIOR, I.S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. **In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus***. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 94, p. 117-125, 2000.

FREEMAN, S., KATAN, T., AND SHABI, E. **Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits**. Plant Disease 82: 596-605, 1998.

GALVÃO, R. M. S. **Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais frequentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota***. São Carlos, 1998. 151 f. Tese (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos.

GIMENEZ-PECCI, M.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; KRIGER-DE-MORAES, C.; CORREA, C.T.; HENNING-VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. **Characterization of Mycoviruses and Analyses of Chitinase Secretion in the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae***. Current Microbiology, New York. v. 45, n. 5, p. 334-339, 2002.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995. 115 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. **Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus**. Genetic and Molecular Biology, v. 25, n.2, p.251-255, 2002.

GUERRA, M^a. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUEZ, Z. M.; RUBALCADA, Y. **Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Inst. Superior de Ciências Médicas de La Habana. Revista Cubana Plant. Med., v. 5, n. 1, p. 5- 23, 2000.

GUIMARÃES, V. C. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paulinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mar.) Ducke e análise da variabilidade genética detectada por marcadores RAPD no endófito *Glomerella cingulata***. Manaus, 1998. 115 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas.

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. **Random amplified polymorphic DNA markers: a systems for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola***. Phytopathology, v. 82, p.832-835, 1992.

GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L.; NODARI, R.; JOHNSON, W. C.; TEMPLE, S. R.; MANDALA, D.; MIKANDAWIRE, A. B. C.; GEPTS, S. **Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Phytopathology, v. 85, p. 600-607, 1995.

GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE, S.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GILBERTSON, R. L. **Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers**. Plant Disease, v. 83, p. 37- 42, 1999.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. **Bacterial endophytes in agricultural crops**. Canadian Journal of Microbiology, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAWKSWORTH, D. L., B. C. SUTTON, and G. C. AINSWORTH. Pp. 30-31 in **Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi**. CAB International, Kew, 1983.

HOLMES, G. J.; ECKERT, J. W.; PITT, J. I. **Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of Citrus fruits**. Phytopathology, v. 84, p. 719-727, 1994.

HOWITT, R.L.J.; BEEVER, R.E.; PEARSON, M.N.; FORSTER, R.L.S. **Presence of**

double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. Mycological Research, Cambridge, v. 99, p. 1472-1478, 1995.

JAMIL, F. F.; SARWAR, N.; SARWAR, M.; KHAN, J. A.; GEISTLINGER, J.; KAHAL, G. **Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.).** Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 57, p. 243-254, 2000.

JIMÉNEZ-GASCO, M.; PÉREZ-ARTÉS, W.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. **Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD).** European Journal of Plant Pathology, v.107, p.237-248, 2001.

JORGE LIF, MARKMANN BEO. **Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira).** Rev Ciênc Farm (São Paulo).;17: 139-45. (Porto Alegre). 2000;8(4):220-6, 1996.

KAISTHA, K. K. & KIER, L. B. **Structural studies on terebinthone from *Schinus terebinthifolius*.** Journal of Pharmaceutical Sciences 51: 245-248, 1962.

KAVA-CORDEIRO, V. ***Guignardia citricarpa*, *G.mangiferae* e *Phylosticta spinarum*: Caracterização morfológica, scars e Rna dupla fita.**Tese de doutorado,2004.UFPR.Curitiba,Paraná.131p

KELEMU, S.; SKINNER, D. Z.; BADEL, J. L.; MORENO, C. X.; RODRIGUEZ, M. X.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J.; CHAKRABORTY, S. **Genetic diversity in South American *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume.** European Journal of Plant Pathology, v. 105, p. 261-272, 1999.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL Jr., V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico.** 5a. edição. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro-RJ, 2001.

KÜSTER, E.; WILLIAMS, S. T. **Selection of media for isolation of streptomycetes.** Nature, v. 202, p. 928-929, 1964.

LARDNER, R.; JOHNSTON, P. R.; PLUMMER, K. M.; PEARSON, M. N. **Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato.** Mycological Research, v. 103, n. 3, p. 275-285, 1999.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLO, D.J.; BALL, B.V.; BUTT, T.M. **Presense of double-stranded RNAs and virus-like particles in the entomopathogenic fungus**

Metarhizium anisopliae. Biocontrol Science and Technology, Abingdon, v.4, p. 89-94, 1994.

LEE, J. C.; STROBEL, G.A.; LOBKOSKY, E.; CLARDY, J. C. **Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora***. Journal of Organic Chemistry, v. 61. p. 3232-3233, 1996.

LI, J. Y.; STROBEL, G. A. **Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri***. Phytochemistry, v. 57, p. 261-265, 2001.

LI, J. Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; TOMBE, B. O.; BASHYAL, B.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. **Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp. And *Monochaetia* sp.** Phytochemistry, v. 56(5), p. 463-468, 2001.

LIEW, E. C. Y.; IRWING, J. A. G. **Comparative studies on *Phytophthora megasperma* isolates from chickpea in Australia and Spain**. Micological Research, v. 98, p.1284-1290, 1994.

LIU, D; HEESWIJCK, R.; LATCH, G.; LEONFORTE, T.; PANACCIO, M.; LANGFORD, C.; CUNNINGHAM, P.; REED, K. **Rapid identification of 99 *Acremonium lolii* and *Acremonium coenophialum* endophytes trough arbitrarily primed PCR**. FEMS Microbiology Letters, v. 133, p.95-98, 1995.

LONGO, A. C. **Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae***. Piracicaba, 1996. 101 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. D.E.A. **Plantas Medicinais no Brasil/Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 511 p, 2002.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. **New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua***. Plant Science, v. 151, p. 67-73, 2000.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. **New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua***. Plant Science, v. 151, p. 67-73, 2000.

LU, G. Z.; CANNON, P. F.; REID, A.; SIMMONS, C. M. **Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana**. Mycological Research, v. 108, n. 1, p. 53-63, 2004.

MAIATAN, V.R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. Goiânia, 1998. 122f. Dissertação – Universidade Federal de Goiás.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. **Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi from carnation**. Phytopathology, v. 84, p. 98-101, 1993.

MARTINEZ-CULEBRAS, P. V.; BARRIO, E.; SUAREZ-FERNANDEZ, M. B.; GARCIA-LOPEZ, M. D.; QUEROL, A. **RAPD analysis of *Colletotrichum* species isolated from strawberry and the design of specific primers for the identification of *C. frágariae***. Journal of Phytopathology, v. 150, p. 680-686, 2002.

MARTINS, M.K.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H. **Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride***. Current Genetics, Berlin, v. 36, p. 94-7, 1999.

McCABE, P.M.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN, N.K. **The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi**. Trends in Microbiology, Limerick, v. 7, p. 377- 381, 1999.

MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, G.; LINDERS, E. G. A. **Variability for isozyme, vegetative, compatibility, and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria***. Mycological Research, v. 98, n. 3, p. 267-276, 1994.

MELZER, M.S.; BOLAND, G.J. **Transmissible hipovirulence in *Sclerotinia minor***. Canadian Journal of Plant Pathology, Guelph, v. 18, p. 19-28, 1996.

MELZER, M.J.; BIDOCHKA, M.J. **Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence**. Mycologia, v.90, n.4, p.586-594, 1998.

MERTENS, P. **The dsRNA viruses**. Virus Research, Shannon, v.101, p. 3-13, 2004.

MORIWAKI, J.; TOYOZO, S.; TSUKIBOSHI, T. **Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan**. Mycoscience 44:47–53, 2003.

MOSTAFA, M.; REZA, Z. M.; OMID, J.; JAVAD, H. M. **Use of rapd, enzyme activity staining, and colony size to differentiate phytopathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from Iran**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 33, p.299- 303, 2002.

MUNAUT, F., HAMAIDE, N. STAPPEN, J.V. & MAREITE, H. **Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers.** Plant Pathology 47:641-648, 1998.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARAITE, H. **Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications.** Mycological Research, v. 106, n. 5, p. 579-593, 2002.

NICHOLSON, P.; REZANOON, H. N. **The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*.** Mycological Research, v. 98, n. 1, p. 13-21, 1994.

NUSS, D.L.; KOLTIN, Y. **Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi.** Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 28, p. 37-58, 1990.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. **Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants.** Canadian Journal of Botany, v. 76, p. 657-663, 1998.

OLIVEIRA, F.; GROTTA, A. S.. **Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae).** Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo 3: 271-93, 1965.

OLIVEIRA, V. M. DE; SETTE L.D.; FANTINATTI- GARBOGGINI, F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos,** 2006.

PANDEY, A.K.; REDDY, M.S.; SURYANARAYANAN, T.S. **ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees.** Mycological Research, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.

PAPP, T.; NYILASI, I.; FEKETE, C.; FERENCZY, L.; VAGVOLGYI, C. **Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Rhizopus* isolates.** Canadian Journal of Microbiology 47: 443–447, 2001.

PENNA, E. B. da S. **Microrganismos endofíticos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, ST.HIL.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. Por RAPD.** Curitiba, 2000. 123 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L. **Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil.** Journal of Phytopathology, Oxford, v. 150, n. 3, p. 128-134, Mar. 2002.

PETRINI, O. **Fungal endophytes of tree leaves**. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer-Verlag. p. 179-197, 1991.

PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J., FOTO, R.; RYCE, K. D.; LUMYONG, S. **Morfological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand**. *Fungal Diversity*, v.18, p.117-1333, 2005.

PILEGGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Tese de Doutorado 2006 – Universidade Federal do Paraná.

PILLEGGI, S.A.V. Comunicação pessoal, 2008

PIMENTEL, I.C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A.M.; AZEVEDO, J.L. **Fungos endofíticos do Milho (*Zea mays* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas**. In *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Foz do Iguaçu, p. 24, 2001a.

PIMENTEL, I.C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A.M.; AZEVEDO, J.L. **Fungos endofíticos da soja (*Glycine Max* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas**. In *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Foz do Iguaçu, p. 28, 2001b.

PREISIG, O.; MOLELEKI, N.; SMIT, W.A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M.J. **A novel RNA micovirus in hipovirulent isolate of the plant pathogen *Diaphorte ambigua***. *Journal of General Virology*, Reading, v 81, p. 3107-3114, 2000.

PUNJA, Z.K. **Influence of double-stranded RNA on growth, sporulation, pathogenicity, and survival of *Chalara elegans***. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.73, p.1001- 1009, 1994.

PYUNG, A.I.; HWAN, L.Y. **A viral double-stranded RNA upregulates the fungal virulence of *Nectria radicicola***. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 14: 496–567, 2001.

RAEDER, U.; BRODA, P. **Rapid preparation of DNA from filamentous fungi**. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.1, p.17-20, 1985.

RAWLINSON C.J., CARPENTER J.M., MUTHYALU G. **Double stranded-RNA virus in *Colletotrichum lindemuthianaun***. *TRANSACTIONS OF THE BRITISH MYCOLOGICAL SOCIETY* . Vol. 65, Pag. 305, 1975

RIBAS, M.O; SOUSA, M.H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T.A.; NORONHA, L.; ACRA, L.A. **Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato.** Revista Odonto Ciência. Facul. Odont./PUCRGs, vol 21, n.53, 2006.

RIBEIRO, L. A. **Variabilidade genética por RAPD em fungos endofíticos do gênero *Penicillium* provenientes de *Zea mays* L.** Curitiba, 90 f.1995. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ROBINSON; H.L.; DEACON, J.W. **Double stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG3.** Mycological Res.106:12-22, 2002.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. **Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions.** In: HYDE, K. D. Diversity of Tropical Microfungi. Hong Kong, University of Hong Kong Press, 1997. p. 57-69.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York, Exeter Publishing, 1988.

ROY, S.; SIMON, J. P.; LAPOINTRE, F. J. **Determination of origin of the coldadapted populations of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) in eastern North America: a total evidence approach using RAPD DNA and DNA sequences.** Canadian Journal of Botany, v. 78, p.1501-1513, 2000.

RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D.R.; AZEVEDO, J.L. **Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease.** International Journal Biology Science, v. 1, p. 24-33, 2005.

SAHA, T.; KUMAR, A.; RAVINDRAN, M.; JACOB, C. K.; ROY, B.; NAZEER, M. A. **Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms.** Mycological Research, v. 106, n. 2, p. 215-221, 2002.

SANTI, L.; MORAES, C.K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. **Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Existe diferença na infectividade entre as linhagens infectadas ou não infectadas por micovírus?** In.: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 46., 2000, Águas de Lindóia. Programas e Resumos. Águas de Lindóia: SBG, p. 341, 2000.

SCHUTZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A-K.; KROHN, K. **Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites**. Cambridge University Press, v. 106, p. 996-1004, 2002.

SEYMOUR, F. A.; CRESSWELL, J. E.; FISHER, P. J.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HAAG, H.; TALBOT, N. J. **The influence of genotypic variation on metabolite diversity in populations of two endophytic fungal species**. Fungal Genetics and Biology, v. 41, n. 7, p. 721-734, 2004.

SHARMA, P. N.; Kaur, M.; SHARMA, O. P.; SHARMA, P.; PATHANIA, A. **Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici*, the cause of fruit rot of chillies in the subtropical region of North-Western India**. Journal of Phytopathology, v. 153, p. 232-237, 2005.

SHELBOURN, S.L.; DAY, P.R.; BUCK, K.W. **Relationships and functions of virus double-stranded RNA in a P4 Killer Strain of *Ustilago maydis***. Journal of General Virology, Reading, v. 69, p. 975-982, 1988.

SHRESTHA, K.; STROBEL, G. A.; SHRIVASTAVA, S. P.; GEWALI, M. B. **Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal**. Planta Medica, v. 67, n. 4, p. 374-376, 2001.

SILVA, F.DE A.S.E. **The ASSISTAT Software: statistical assistance**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, p.294-298,1996.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. **Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

SILVA, T. M., **RNA dupla-fita em *Guignardia citricarpa* e estimativa do número de cromossomos em *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum***. Dissertação (Mestrado), Curitiba, UFPR, 2008. Orientador: Prof. Dra. Chirlei Glienke. Universidade Federal do Paraná.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. **Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas**. Fitopatologia Brasileira, v. 27, n. 1, p. 27-32, 2002.

SILVEIRA, V.D. **Micologia I**. 4 ed., Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 332 p.1981

SINCLAIR, J. B. **Latent infection of soybean plants and seeds by fungi.** Plant Disease, St. Paul, v. 75, n. 3, p. 220-224, 1991.

SKIPP, R.A.; BEEVER, R.E.; SHARROCK, K.R.; RIKKERINK, E.H.A.; TEMPLETON, M.D. *Colletotrichum* In: Kohmoto, K., Singh, U. S., and Singh, R. P., eds., Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. In: Kohmoto, K., Singh, E.U., e Singh, RP, ed., Pathogenesis e Host Specificity em Plant Diseases. **Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Basis.** Vol II Eukaryotes. Elsevier Science , New York, 1995.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy.** W. H. freeman & Co: San Francisco, 1973.

SOUZA, A.O. **Bactérias endofíticas do milho (*Zea mays* L.) e sua variabilidade genética analisada por RAPD.** Piracicaba, 1996. 85f. Dissertação de Mestrado – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SOUZA, L. P.; ASTOLFI F. S.; PEREIRA, J.O. **Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais.** Resumos da 7ª Reunião Especial da SBPC. Manaus-AM. 2001.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; SPARTACO, A.F.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*.** Acta Amazonic. v.34, n.2 , Manaus, 2004.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. **Production and characterization of a thermostable alfa-amylase from *Nocardiosis* sp. endophyte of yam bean.** Bioresource Technology, v. 76, p. 137-141, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. **Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves.** Bioresource Technology, v. 83, p. 105-109, 2002.

STEENKAMP, E.T.; WINGFIELD, B.D.; SWART, W.J.; WINGFIELD, M.J. **Double-stranded RNA and associated virulence in South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*.** Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.76, p.1412-1417, 1998.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. **The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the**

Pacific yew, *Taxus brevifolia*. Journal of Natural Products, v. 58, n. 9, p. 1315-1324, sept., 1995.

STRINGARI, D. **Estudo da Variabilidade Genética de *Guignardia* ssp. Por meio de Marcadores RAPD e seqüências ITS.101f** . Curitiba, 2004. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.

STROBEL, G.A.; STIERLE, A.; STIERLE, D.; HESS, W. M. ***Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a *bulbilliferous hyphomycete* associated with Pacific yew.** Mycotaxon v. 47, p. 71-78, 1993.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E. J.; SIDHU, R. S.; YANG, X. **Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity.** Microbiology, v.17, p.417-423, 1996.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E. J.; SIDHU, R. S.; SUMMERELL, B. ***Pestalotiopsis guepinii*, a taxol producing endophyte of the *Wollemi Pine*, *Wollemia nobilis*.** Australian Journal Botanic. v.45, p.1073-1082, 1997.

STROBEL, G. A.; MILLER, R. V.; MILLER, C.; CONDRON, M.; TELOW, D. B.; HESS, W. M. **Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*.** Microbiology, v.145, p. 1919–1926, 1999.

STROBEL, G.A.; METZ, A.M.; HADDAD, A.; WORAPONGA J.; LONG, D.M.; FORD, E.J.; HESS, W.M. **Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus.** Microbiology, v 146, p. 2079-2089, 2000.

STROBEL, G. A. **Rainforest endophytes and bioactive products.** Critical Review Biotechnologic, v. 22, p. 315–333, 2002.

STROBEL, G.A. **Endophytes as sources of bioactive products.** Microbes Infection, v. 5, p.535–544, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. H. **Biosprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 67, p. 491-502, 2003.

SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. **Endophytes as producers of xylanase.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 93, n. 1, p. 88-90, 2002.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata.** Kew: Commonwealth Mycological Institute, 960p, 1980.

SUTTON, B.C. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum***. In: Bailey JA, Jeger MJ (eds) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB International, Wallingford, pp 1– 26,1992.

TIAGO, P.V. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2001.

VALÉRIO, H. M.; RESENDE, M. A.; WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; CASELLA, C. R. **Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola***. Mycopathologia, v. 159, p. 449-459, 2005.

VARGA, J.; KEVEI, F.; VAGVOLGYI, C. **Double stranded RNA mycoviruses in section Nigri of the *Aspergillus* genus**. Canadian Journal of Microbiology 40: 325–329,1994.

VICENTE, V.A. Comunicação pessoal,2007.

VIRET, O.; PETRINI, O. **Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*)**. Mycological Research, v. 98, p. 423-432, 1994.

VON ARX, J.A. **Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda**. Phytopathologische Zeitschrift 29:414-468, 1957.

VON ARX, J.A. **A revision of the fungi classified as *Gloeosporium***. Bibliotheca Mycologica 24: 1-203, 1970

WANG, J.; Li, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG Y.; SU, W. **Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei***. FEMS Microbiology. Letters.v. 193, p. 249-253, 2000.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers**. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 18, n. 24, p.7213-7218, 1990.

WHARTON, P.S. AND DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. **The biology of *Colletotrichum acutatum***. Anales del Jardín Botánico de Madrid 61(1):3-22. 2004

WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. **Endophyte-host associations in forage grasses. V. Ocorrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa***. Mycology, Lawrence, v. 78, n.5, p.846-850, 1986.

WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G. ; MORROW, A.C. **Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes.** Agriculture Ecosystem & Environment, v. 44, p.13-37, 1993.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBLELIK, A. R. LIVAK, K. J. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acid Research, v.18, p. 6531-5, 1990.

WRIGHT, S.F.; FRANKE-SNYDER, M.; MORTON, J.B.; UPADHYAYA, A. **Time course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots.** Plant and Soil 181, 193–203, 1996.

YUAN, G. F.; LIU, C. S.; CHEN, C. C. **Differentiation on *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA.** Applied and Environmental Microbiology, v. 61, p. 2384-2387, 1995.

ZABALGOGEAZCOA, I; BENITO, E.P.; CIUDAD, A.G; CRIADO,B.G.; ESLAVA,A.P.; **Double stranded RNA and virus-like particles in the grass endophyte *Epicloe festucae*.** Mycological Research, Cambridge, v 102,p-914-918,1998.

ZHOU, T, BOLAND G.J. **Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*.** Canadian Journal of Plant Pathology 21:93-99. 1999

ZOU, W. X.; TAN, R. X. **Endophytes: a rich source of functional metabolites.** NPR, v.18, p. 448-459, 2001.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y., TAN, R. X. **Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*.** Journal of Natural Products, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.